Aus der Fachrichtung Anatomie Fachbereich 3 (Theoretische Medizin)
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Die GOLGI-Imprägnierungsmethoden für Elektronenmikroskopie: Röntgenmikroanalytische und vergleichende Untersuchungen.

Dissertation zur Erlangungen des Grades der Medizin
der Universität des Saarlandes
1986

vorgelegt von
FELIPE L. SCHNEIDER
geboren am 15.06.1952
in Porte Alegre, Brasilien

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552704_0010

Aus der Fachrichtung Anatomie Fachbereich 3 (Theoretische Medizin)
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Die GOLGI-Imprägnierungsmethoden für Elektronenmikroskopie: Röntgenmikroanalytische und vergleichende Untersuchungen.

Dissertation zur Erlangungen des Grades der Medizin
der Universität des Saarlandes
1986

vorgelegt von
FELIPE L. SCHNEIDER
geboren am 15.06.1952
in Porte Alegre, Brasilien

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Juli 1986

Tag des Vollzugs der Promotion: 16. Juli 1986

Dekan: Prof. Dr. Paul Fritsche

Berichterstatter: 1. Prof. Dr. Pedro Mestres

2. Prof. Dr. Gerhard Werner

Gedruckt mit Unterstützung des Deutschen Akademischen Austauschdienstes

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1.	ZUSAMMENFASSUNG	1
2.	EINLEITUNG	5
2.1	GOLGI-Methode: kurzer historischer Bericht	5
2.2	Tabelle: Literaturübersicht über die GOLGI-Elektronenmikroskopiemethoden	10
2.3	Fragestellung	11
3.	MATERIAL UND METHODIK	12
4.	ERGEBNISSE	16
4.1	Mikroanalyse von Plastikschnitten im Rasterelektronenmikroskop	
4.2	Mikroanalyse von Ultradünnschnitten im Transmissionselektronenmikroskop	28
4.3	De-Imprägnierungsmethoden für GOLGI-Elektronenmikroskopie. Vergleichende Studien	38
5.	DISKUSSION	75
6.	LITERATURVERZEICHNIS	88
7.	DANK	98
8.	LEBENSLAUF	99

Hinweis:

Die vorliegende Form der Arbeit ist eine 0.7-fache Verkleinerung des Originals. Alle angegebenen Vergrößerungen sind dementsprechend umzurechnen.

1. ZUSAMMENFASSUNG

Die GOLGI-Methoden für Elektronenmikroskopie ermöglichen die korrelative Untersuchung einer mit Silberchromat imprägnierten Nervenzelle auf Licht- und elektronenoptischer Ebene. Um GOLGI-behandeltes Gewebe im Elektronenmikroskop betrachten zu können, wurden folgende Modifikationen des Grundverfahrens geprüft: 1) Behandlung mit Goldchlorid (Gold-Tonierung); 2) Lichtexposition und anschließend Gold-Tonierung; 3) chemische Reduktion mit D 19 Kodak; 4) chemische Reduktion und anschließend Gold-Tonierung. Um die Veränderungen der Silberchromatkristalle, die nach diesen Behandlungen auftreten, besser zu verstehen, wurde die elementare Zusammensetzung der Präzipitate analysiert. Darüberhinaus wurden diese Methoden verglichen, um ihre Leistungsfähigkeit und Qualität in morphologischer Hinsicht zu überprüfen.

Junge Ratten wurden mit gepufferten Aldehyden fixiert und Gewebsblöcke verschiedener Hirngebiete in einer Osmium-Kalium-Dichromatlösung vor der Versilberung postfixiert (GOLGI-Methode). Schnitte verschiedener Dicke wurden mikroanalytisch und morphologisch im Raster- und Transmissionselektronenmikroskop untersucht. Folgende Resultate wurden aus der Mikroanalyse erhoben: Nach Gold-Tonierung enthalten die Präzipitate Gold und Silber. Nach Lichtexposition und Gold-Tonierung bestehen sie nur aus Gold. Aus der chemischen Reduktion mit D 19 Kodak entstehen Partikel, die nur Silber enthalten, die aber nach der Gold-Tonierung auch Gold besitzen. Daraus kann geschlossen werden, daß nur nach Lichtexposition und Gold-Tonierung eine vollständige Substitution des Silbers durch Gold stattfindet. Bei den anderen Methoden ist die Substitution unvollständig und infolgedessen treten gemischte Partikel auf. Die morphologische Untersuchung der imprägnierten Neuronen und Gliazellen hängt weitgehend von Gestalt und Größe der Präzipitate und vom Fehlen von Artefakten (Diffusion der Präzipitate) ab. In diesem Zusammenhang wurden deutliche Unterschiede zwischen den oben genannten Methoden festgestellt. Bei der

einfachen Gold-Tonierung bilden sich die kleinsten Präzipitate, dadurch können die dünnsten Ausläufer von Neuronen und Gliazellen dargestellt werden. Jedoch nur nach Lichtexposition und Gold-Tonierung bleiben besondere Gliatypen wie die Tanyzyten des Hypothalamus imprägniert. Die chemischen Reduktionsverfahren haben gegenüber der Gold-Tonierung den Nachteil, daß Diffusionsartefakten auftreten können.

THE GOLGI-METHODS FOR ELECTRON MICROSCOPY.
X-RAY microanalysis and comparative studies.

SUMMARY

GOLGI-EM methods allow the investigator to examine GOLGI-stained neurons at both the light and the electron microscope level. For ultrastructural studies the crystals were transformed by: 1) treating them with gold chloride (gold-toning), 2) exposing them to light and then gold-toning them, 3) reducing them with D 19 Kodak developer, or 4) reducing them chemically and then gold-toning them. In order to understand and improve the techniques, it was essential to clarify the elementary nature of the precipitates.

Brain tissue of young rats was fixed with buffered aldehydes and postfixed in an osmium potassium dichromate solution prior to the "coloring" step in silver nitrate. Microchopper sections containing stained neurons were treated as listed above. Sections of various thicknesses (semithin and ultrathin) were investigated with a microprobe in a scanning electron microscope or in a transmission electron microscope.

Microanalysis revealed that after gold-toning (treatment 1) the particles contained both gold and silver. After exposure to light and gold-toning (treatment 2) the particles contained only gold. After chemical reduction with D 19 (treatment 3) they contained only silver. However, if this treatment was followed by gold-toning (treatment 4) their composition was changed and they contained both gold and silver. These oberservations indicate that only after exposure to light followed by gold-toning does a complete metal substitution take place.

The elementary composition and morphology (size, shape and location) of precipitates are important criteria for evaluating the success of these methods. The gold-toning treatment alone produces the smallest precipitates, making it possible to label very thin processes of neurons and also glial cells. Special types of glial cells such as the hypothalamic tanycytes, could only be investigated after exposure to light followed by gold-toning. Chemical reduction is disadvantageous because it may be accompanied by diffusion artefacts.

2. E I N L E I T U N G

2.1 G O L G I - Methode - kurzer historischer Bericht -

Der Morphologe Camilo G O L G I, Anatom an der Universität in Pavia, entwickelte 1873 eine Methode, die heute seinen Namen trägt und die sich für die Untersuchung des zentralen Nervensystems (ZNS) als eine der wichtigsten erwiesen hat. Diese Methode ist im Prinzip relativ einfach. Man läßt Chromat- und Silberionen im Gewebe miteinander reagieren; dabei entstehen in den Nerven und Gliazellen Silberchromatkristalle, durch welche die Zellen dargestellt werden.

Ein Nachteil, aber auch ein entscheidender Vorteil dieses Verfahrens liegt darin, daß nur ein kleiner Prozentsatz der im Gewebe vorhandenen Zellen, nämlich 5 bis 10% (SCHEIBEL u. SCHEIBEL, 1978) sich anfärben lassen und somit voneinander abgrenzbar sind. Deshalb ist es möglich, diese Zellen in ihrer Gesamtheit morphologisch zu analysieren. Dies bedeutet, daß anatomische Merkmale eines Neurons, wie Form des Perikaryons, Verzweigungsmuster der Zellausläufer, räumliche oder dreidimensinale Anordnung von Dendriten, das Vorhandensein von dendritischen Dornen, Axonkollateralen mit erstaunlicher Exaktheit erfaßt werden können. Trotz vieler Varianten und Modifikationen war und bleibt die GOLGI-Methode mit gewissen Unberechenbarkeiten behaftet. Besonders in den Anfangszeiten konnte man keine Voraussage machen, welche Zellen, wenn überhaupt, sich anfärben würden. Die Untersuchungen von CAJAL haben in entscheidender Weise dazu beigetragen, diese Probleme des GOLGI-Verfahrens abzuschwächen. Es zeigte sich, daß dem Gewebe eine entscheidende Rolle zukommt, z.B. hängen die Resultate der GOLGI-Imprägnierung u.a. von der Spezies, vom Alter des Tieres, von der Entwicklung und dem Reifestadium (z.B. dem Myelinisierungsgrad) des ZNS ab (CAJAL u.DE CASTRO, 1972; VALVERDE, 1970).

Auch die Art und Weise, wie die Imprägnierung durchgeführt wird, scheint von großer Bedeutung zu sein, um zu wiederholbaren Ergebnissen zu kommen. In diesem Zusammenhang soll auf die Einführung der doppelten und dreifachen Imprägnierung durch CAJAL hingewiesen werden (CAJAL u. DE CASTRO, 1972; VALVERDE 1970). Die Kontroverse zwischen den Vertretern des "Retikularismus" und des "Neuronalismus", die weitgehend die neurobilogische wissenschaftliche Landschaft um die Jahrhundertwende charkterisierte, wurde durch Studien unter Anwendung der GOLGI-Methode deutlich beeinflußt. Zahlreiche Beobachtungen bestätigen die Thesen von HIS und FOREL, sowie später von CAJAL, daß die Nervenzellen eine Zellindividualität besitzen (CAJAL, 1935). Thesen des "Retikularismus", die auch GOLGI verteidigte, verloren allmählich an Bedeutung.

GOLGI und CAJAL befaßten sich nur am Rande mit den chemischen Grundlagen der Silberdichromatfärbung. Andere Wissenschaftler dagegen, welche die GOLGI-Methode mit anderen histologischen Techniken zu kombinieren versuchten, wendeten sich dieser Frage intensiver zu. Zahlreiche Modifikationen und Nachbehandlungen der Silberdichromatimprägnierung wurden eingeführt, einerseits um die GOLGI-Färbung langfristig zu stabilisieren (Haltbarkeit der Präparate), andererseits, um sie mit anderen Färbemethoden kompatibel zu machen. Nach GOLGI sollte die "reazione nera" - so nannte er seine Methode - auf die Reduktion des Silbernitrats durch die Gewebsmaterie unter Einfluß des Dichromats zurückzuführen sein. Andere Autoren stimmten dieser Hypothese nicht zu(SEHRWALD, 1889; ZIMMERMANN, 1898; GREPPIN, 1889). Die Beobachtung, daß unter Einfluß von Halogenderivaten, Ammoniak, sowie Natriumbisulfiden sich die GOLGI-Präzipitate bzw. Kristalle verändern, sogar auflösen, sprach gegen die These des reduzierten Silbers. Der Einfluß von Reduktoren, wie z.B. fotografischer Entwickler auf GOLGI-Präzipitate

bzw. Kristalle wurde ebenfalls untersucht (SEHRWALD, 1889). Nach der Reduktion des Silberchromats wurden die Präzipitate zwar sehr stabil, aber die Färbung der dünnen Zellfortsätze verlor an Qualität, häufig entfärbten sie sich sogar vollkommen. Andere Autoren schließlich, unter ihnen auch CAJAL, haben die Präzipitate als Kristalle aus Silberchromat gedeutet.

Das "goldene Zeitalter" des GOLGI-Verfahrens lag um die Jahrhundertwende. Danach wurde diese Technik immer weniger eingesetzt und die Anzahl der Publikationen, die sich mit dieser Methode befaßten, wurde immer kleiner. Diese Entwicklung setzte sich bis in die dreißiger Jahre fort, wo die "reazione nera" fast in Vergessenheit geriet. Zu Beginn der fünfziger Jahre erfuhr die Methode von GOLGI eine unerwartete "Renaissance" (SCHEIBEL u. SCHEIBEL, 1970). Gründe für diese Wiederentdeckung mögen in der Einführung der Elektronenmikroskopie und der Mikroelektronenphysiologie in die Untersuchungen des ZNS liegen. Die GOLGI-Methode wurde in diesem neuen Umfeld als unersetzlich betrachtet, um Fragen der räumlichen Anordnung von Neuronen, der anatomischen Struktur von Schaltkreisen, Veränderungen während der Neurogene usw. zu klären (SCHEIBEL u. SCHEIBEL, 1964).

Auch heute noch findet die Methode Anwendung und Anerkennung unter den Neuropathologen. Veränderungen des Zellmusters (cell pattern) eines Hirngebietes in Zusammenhang mit Neonatal-Pathologie und mit der Alterung sind Problembereiche, in denen diese Technik ganz gezielt eingesetzt werden kann (BRAAK u. BRAAK, 1985; KLATZO, 1952; WILLIAMS et al., 1978). Die für diese Entwicklungen notwendigen Vorarbeiten zum Thema Neurogenese liegen vor und stellen eine solide Grundlage dar, auf welche neuropathologische Studien sich beziehen können. Die Migration aus der Matrixzone und die Differenzierung einer ganzen Reihe von Neuronentypen wurde im ZNS verschiedener Vertebraten schon in

den zwanziger Jahren untersucht und beschrieben (CAJAL, s. JACOBSON, 1978). Mit der GOLGI-Methode konnte die Bildung von Dendriten, Axonen sowie das Zustandekommen synaptischer Kontakte verfolgt werden. Letzteres führte zur Beschreibung komplexer histologischer Muster (Histogenese), die charakteristisch für jede Region des ZNS sind (SCHEIBEL u. SCHEIBEL, 1964; JACOBSON, 1978). Zeitliche Korrelate über die Reifung des ZNS auf histologischer Ebene wurden in verschiedenen Spezies, zum Teil auch vom Menschen erstellt.

Auch in Studien über die Plastizität des ZNS findet die GOLGI-Methode Anwendung. In diesem Zusammenhang seien morphologische und quantitative Untersuchungen über die Veränderungen der Gehirnstruktur nach Entbehrung (Deprivation) des sensorischen Inputs erwähnt (VALVERDE, 1970).

In der Neuroanantomie übernahm die Elektronenmikroskopie eine führende Stellung. Das Korrelieren von Daten der Lichtmikroskopie mit denen der Elektronenmikroskopie stellte sich ganz speziell in der Neuroanatomie als ein großes Problem heraus. Es wurde versucht, die Methoden der GOLGI - Imprägnierung und der Elektronenmikroskopie zu kombinieren (vgl. Tabelle). Das Verfahren, das durch FAIREN et. al., 1977 eingeführt wurde, hat die GOLGI-Elektronenmikroskopie (GOLGI-EM) wesentlich beeinflußt. Man kann also, historisch gesehen, von zwei abgrenzbaren Perioden sprechen, vor und nach 1977.
Alle GOLGI-Techniken haben ein gemeinsames Ziel, nämlich die Verkleinerung der Silberchromatkristalle. Dies geht mit einem Verlust an "Färbung" der Zellen einher; man spricht von De-Imprägnierungsmethoden für die GOLGI-EM.

Von den vielen Varianten (s. Tabelle) können 4 technische Prinzipien als besonders effektive Verfahren herausgestellt werden:

1.- Techniken, durch welche die Größe und Anzahl der Partikel verringert werden können, ohne die chemische Zusammensetzung zu verändern (z.B. BRAAK u. BRAAK, 1984)

2.- Techniken, die auf der Basis einer Metallsubstitution beruhen (z.B. die Gold-Tonierung, FAIREN et. al., 1977)

3.- Techniken, die sich den Einfluß des UV-Lichtes oder des polychromatischen Lichtes zunutze machen (fotochemische Methoden, BLACKSTAD, 1975,1981) und die mit der Metallsubstitution kombiniert werden können.

4.- Techniken, bei denen mit fotografischen Entwicklern eine chemische Reduktion herbeigeführt wird (WOUTERLOOD et al. 1983). Aus diesen Entwicklungen heraus haben sich die Anwendungsmöglichkeiten der GOLGI-Verfahren im Bereich der Elektronenmikroskopie noch mehr erweitert, zumal man diese mit anderen neuroanatomischen und zytochemischen Methoden kombinierte, z.B. in Studien über neuronaler Verbindungen und Schaltkreise kombiniert mit einer Reihe von Degenerationsmethoden (BLACKSTAD, 1965,1981; FROTSCHER u. ZIMMER, 1983) oder auch mit TRACER-Methoden, wie z.B. der axonalen retrograden Markierung mit Meerrettichperoxidase (HRP) (FREUND u. SOMOGYI,1983). Die Kombination mit Immuntechniken wurde schon durch BLACKSTAD (1981) vorgeschlagen und einige Jahre später durchgeführt (SOMOGYI et al., 1983, BOLAN et al., 1984; FROTSCHER u. LERANTH, 1986).

Diese oder die kombinierte Anwendung der GOLGI-EM mit autoradiographischen Techniken erlaubt die Charakterisierung des Transmitters eines Neurons und gleichzeitig wichtige Merkmale seiner Morphologie (GOEBEL u. POURCHO, 1982; HITCHCOK u. HICKEY, 1983; SOMOGYI et al., 1984,a,b).

2.2 TABELLE

Literaturübersicht über die GOLGI-EM-Methoden

1. - GOLGI-Originalverfahren ohne Veränderung der Silberchromatkristalle(STELL, 1964,1965; BLACKSTAD, 1965)
2. - De-Imprägnierung mit Ammoniumnitrat (BLACKSTAD, 1970)
3. - HVEM = Hochspannungselektronenmikroskopie (CHAN-PALAY u. PALAY, 1972; CHAN-PALAY, 1973)
4. - Metallsubstitutionen mit Bleinitrat und Bleilactat (RAMON-MOLINER u. FERRARI, 1972,1976)
5. - Verkürzung der Imprägnierungszeit und Herauslösen der Präzipitate mit Oxalsäure am Ultradünnschnitt (ITO u. ATENCIO, 1976)
6. - Unterbrechnung der Imprägnierung "in status nascendi" und HVEM (SCOTT u. GUILLERY, 1974)
7. - Bestrahlung mit UV-Licht (BLACKSTAD, 1975)
8. - Behandlung mit Goldchlorid = Gold-Tonierung (FAIREN et al., 1977)
9. - sehr kurze Imprägnierungszeiten und niedrige Konzentration der Reagenzien (RIBI u. BERG, 1980)
10. - Illumination und Gold-Tonierung (BLACKSTAD, 1981; FAIREN et al., 1981; DE FELIPE u. FAIREN, 1982)
11. - Reduktion mit fotografischem Entwickler mit/oder ohne Gold-Tonierung (WOOTERLOOD et al., 1983)
12. - Auslaugen der Präzipitate mit verdünnter NH_4OH (BRAAK u. BRAAK, 1982)

2.3 FRAGESTELLUNG

Für das Verständnis der (-elektronenoptischen-) GOLGI-EM-Methoden ist es sehr wichtig, die elementare Zusammensetzung der Präzipitate, welche in den imprägnierten Zellen enthalten sind, zu erfassen. Aus diesen Erkenntnissen heraus wäre es möglich, Rückschlüsse zu ziehen über die chemischen Vorgänge, die diesen Techniken zugrunde liegen.

In der vorliegenden Arbeit wird versucht, unter Anwendung der Röntgenmikroanalyse diese Frage zu beantworten. Die energiedispersive Röntgenmikroanalyse (im folgenden abgekürzt: EDS) ermöglicht die Elemantaranalyse elektronenmikroskopischer Objekte bei gleichzeitiger Abbildung der zu analysierenden Objektstelle in Auf- (REM) oder Durchstrahlungsmodus der Elektronenmikroskopie (TEM).

Diese Untersuchungen wurden auf diejenigen Techniken konzentriert, welche am meisten benutzt werden, nämlich die Gold-Tonierung, die Lichtexposition verbunden mit Gold-Tonierung und die Reduktion der GOLGI-Präzipitate mit fotografischem Entwickler. Untersuchungen an GOLGI-gefärbten Zellen ohne De-Imprägnierungen wurden ebenfalls analysiert und dienten als Vergleichsmaterial. An diese mikroanalytischen Untersuchungen schließt sich eine Reihe vergleichender Studien an, um die Effektivität und Qualität aus morphologisch-anatomischer Sicht zu bewerten.

3. MATERIAL UND METHODIK

Diese Untersuchung wurde an Albinoratten (SPRAGUE-DAWLEY) beiderlei Geschlechts durchgeführt. Das Körpergewicht betrug je nach Alter 60 bis 300 g. Die Tiere wurden unter Chloralhydrat-Narkose (0,35 mg/g Körpergewicht) durch Intracardialperfusion fixiert. Zunächst wurde als Vorspülung eine physiologische Lösung (GONZALEZ, DE ROBERTIS, 1963) perfundiert, auf welche eine Phosphat-gepufferte Lösung mit 3% Glutaraldehyd und 1,5% Formaldehyd folgte. Die Gehirne der Tiere verblieben bei 4° C über Nacht im Schädel in derselben Fixierung. Nach der Präparation des Gehirns wurden kleine Blöcke (3-4mm dick) aus den parietalen Lappen der Hirnhemisphäre, aus dem Kleinhirn und aus dem Hypothalamus nach dem raschen GOLGI-Imprägnationsverfahren behandelt (VALVERDE, 1970). Daraufhin wurden sie zunächst 3-4 Tage in einer OsO_4-Kaliumbichromat-Lösung (VALVERDE, 1970) nachfixiert und anschließend 24 Stunden in Silbernitrat (0,75%) eingelegt. Diese imprägnierten Proben wurden dann durch eine aufsteigende Konzentrationsreihe mit Glycerol bei -20° C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Aus diesen Proben wurden mit Hilfe eines Gewebeschneiders (SORVALL-Mikrochopper) 150 µm dicke Schnitte angefertigt. Schnitte aus der Hirnrinde wurden durch eine absteigende Glycerol-Konzentrationsreihe in Aqua dest. geführt und zu weiteren Nachbehandlungen in 4 Gruppen geteilt.

Gruppe 1: Die Schnitte dieser Gruppe wurden keiner zusätzlichen Behandlung unterworfen. Sie dienten als Vergleich für die anderen Gruppen.

Gruppe 2: De-Imprägnierung durch Gold-Tonierung nach dem Verfahren von FAIREN et al., 1977.

Gruppe 3: Lichtexposition der Schnitte, im Anschluß Weiterbehandlung wie Gruppe 2 (FAIREN et al., 1981)

Gruppe 4: Behandlung der Schnitte mit einem Fotoentwickler (Kodak D 19) m i t oder o h n e zusätzliche Gold-Tonierung (WOUTERLOOD et al., 1983)

Die Abb.1 gibt einen Überblick über die verschiedenen Behandlungsverfahren der einzelnen Gruppen. Alle De-Imprägnierungen wurden in einer Dunkelkammer durchgeführt unter Anwendung einer 24 Watt starken Lichtquelle und einem Sicherheitsfilter (Ilford 904), um die Bildung von metallischen Niederschlägen, die durch Einwirkung des Lichtes entstehen könnten, zu vermeiden. Nach der De-Imprägnierung wurden die Schnitte 30 Minuten in 1% igem OsO_4 nachfixiert und "en bloc" mit Uranylacetat kontrastiert. Nach gründlicher Entwässerung in Äthanol erfolgte die Einbettung in Epoxyharz (Araldit 502). Das Material aus der Hirnrinde diente den mikroanalytischen Untersuchungen, die

a) mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM)
b) mit dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM)
durchgeführt wurden.

2.1 REM-M I K R O A N A L Y S E

Plastikschnitte von 0,5 µm, 2 µm und 4 µm Dicke wurden mit Hilfe eines REICHERT U2 Ultramikrotoms (nach SITTE) hergestellt. Für die Ultramikrotomie kamen jeweils neu gebrochene Glasmesser zur Anwendung. Auffangen der Schnitte in Aqua bidest. und Aufziehen auf kleine Glasobjektträger (Quadrate von 5-8 cm Seitenlänge). Ungefärbte und gefärbte Schnitte (Methylenblau-Azur II, nach RICHARDSON et al., 1960) wurden im Hell u. Dunkelfeldverfahren untersucht. Dadurch konnte das Vorhandensein von imprägnierten Zellen bestimmt werden. Nach der Auswahl und Fotografie der Schnitte erfolgte eine Befestigung der Aluminiumträger mittels doppeltem Klebeband. Drei bis sechsmalige Bedampfung der Proben mit Kohle in einem Sputtergerät (BALZER SCDO 30).

Arbeitsbedingungen:

Kohlegarn; Abstand zur Probe: 3cm; Hochspannung; 0,05 mbar Argon.
Die imprägnierten Zellen wurden im REM in einem durch sekundäre Elektronen erzeugten Bild bei einer Spannung von 5 bzw. 20 KV untersucht. Dadurch konnten die Stellen, die mikroanalytisch bewertet werden sollten, lokalisiert werden. Die Untersuchung erfolgte an einem CamScan S-4, ausgerüstet mit einer Mikrosonde (TRACOR Systems). Die Arbeitsbedingungen bei der Mikroanalyse waren folgende:

Winkel der Mikrosonde : 35 Grad; Fensterdicke: 7,5 µm
Fenstermaterial: Beryllium; Aufnahmezeiten der Daten: 60, 100 und 300 sek.; Spannung: 20 KV

2.2 TEM-M I K R O A N A L Y S E

Herstellung der Ultradünnschnitte von 70 bis 100 nm mit Glasmessern an einem REICHERT U2 Ultramikrotom. Die Schnitte kamen in eine Schale mit Aqua bidest, bevor sie auf mit Formvarfolien beschichtete Kupfernetze überführt wurden. Einige Schnitte wurden mit Uranylacetat (5% in Methanol 50%) und Bleicitrat (nach REYNOLDS, 1963) kontrastiert. Untersuchung der Proben in einem HITACHI H 500 Transmissionselektronenmikroskop, das mit einer Mikrosonde KEVEX ausgerüstet war.

Arbeitsbedingungen:

Winkel der Mikrosonde: 65 Grad; Fenstermaterial: Beryllium
Aufnahmezeit der Daten: 100/200 sek.; Spannung: 75 KV

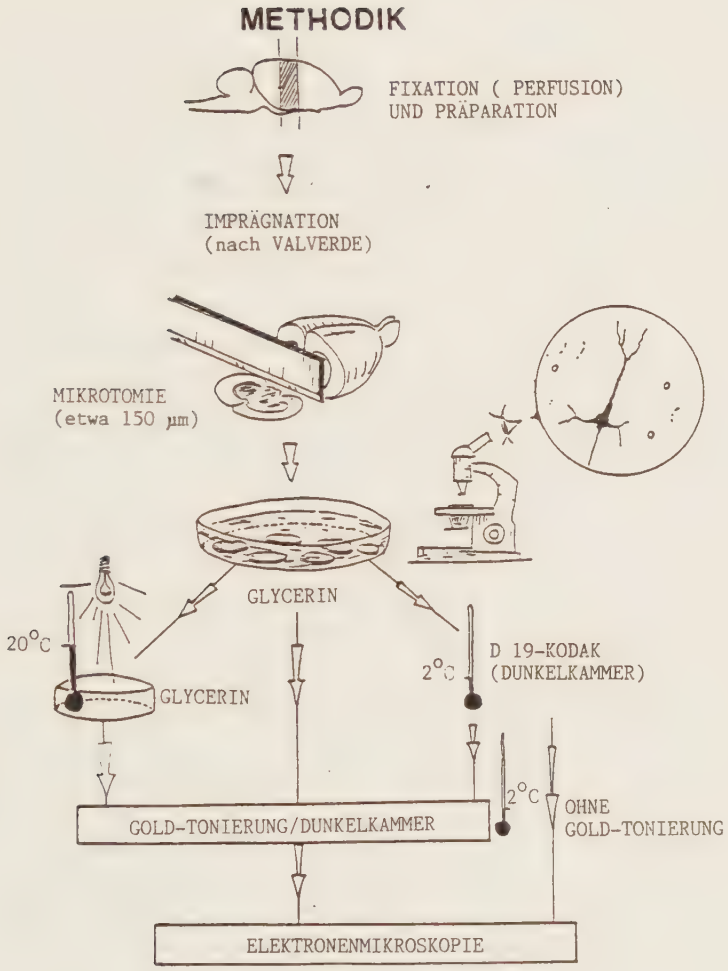


Abb. 1

Schematische Darstellung der Präparation des Materials, sowie der verschiedenen Imprägnierungsmethoden, die in dieser Studie angewandt wurden.

4. ERGEBNISSE

4.1 Mikroanalyse von Plastikschnitten im Rasterelektronenmikroskop

Für diese Untersuchungen wurden Plastikschnitte unterschiedlicher Dicke verwendet. Die Lokalisierung der imprägnierten Zellen erfolgte lichtmikroskopisch unter Verwendung des Hell- und Dunkelfeldverfahrens (Abb.2). Vor allem im Dunkelfeld konnten die relativ kleinen Metallpräzipitate leicht beobachtet werden (Abb.2c').

Für die Lokalisierung der imprägnierten Zellen im REM wurde das aus den sekundären Elektronen entstandene Bild genutzt. Die Schnitte von 0,5 µm lieferten in der Regel bei niedriger Kathodenspannung (5 KV) ein sehr gutes Bild. Die Schnitte von 2 und 4 µm gaben bei 5 KV kein gutes Bild, vor allem wenn die Präzipitate unter der Schnittoberfläche lagen. Hierfür hat sich die Spannung von 20 KV als sehr gut erwiesen (Abb.5 und 6).

Gruppe 1: GOLGI-Imprägnierung ohne Gold-Tonierung und ohne De-Imprägnierung

Die imprägnierten Zellen in diesem Material sind bei niedriger KV-Zahl leicht zu finden, vor allem wegen der großen Zahl von Kristallen. Diese sitzen intrazellulär und lassen daher den gesamten Umriß der Zellen erkennen (Abb.2d). Das Emissionsspektrum von Meßpunkten außerhalb der imprägnierten Zellen zeigt neben dem Fehlen von Silber das Vorhandensein von Chrom (Abb.4). Das Element Chrom stammt aus dem Kaliumdichromat, das für die Fixierung des Gewebes verwendet wurde. Die Verteilung dieses Elementes hängt einerseits von seiner Bindungsfähigkeit an Proteine ab, andererseits jedoch auch von seiner Beteiligung an der Silberchromatbildung. Das Emissionsspektrum der Objekte weist andere Elemente auf. Diese Elemente, nämlich Si, Na, Mg, Ca, K, Cl sind größtenteils in dem Trägerglas vorhanden. In

geringerem Maße befinden sich diese Elemente, außer Si, aber auch im Gewebe, das in den Schnitten enthalten ist. Osmium gelangt durch die Fixierung in das Gewebe; Schwefel erscheint nur in den Emissionsspektren von Plastikschnitten, die mit Methylenblau und Azur II (RICHARDSON et al., 1960) gefärbt wurden, da diese Farbstoffe Schwefel enthalten. Das Aluminium des Probenträgers für REM ist ebenfalls im Spektrum identifizierbar.

Gruppe 2: GOLGI-Imprägnierung mit Gold-Tonierung

Bei diesem Verfahren wird die Größe der Präzipitate im Perikaryon stark reduziert; es treten somit bei der Lokalisierung der imprägnierten Zellen Schwierigkeiten auf (Abb.3a). Das Röntgen-Emissionsspektrum zeigt, daß Gold vorhanden ist (Abb.5). Im EDS-Spektrum liegen die Ausschläge für Silber, Uran und Kalium sehr eng beisammen. Es ergeben sich daraus Interpretationsschwierigkeiten, auf die in der Diskussion eingegangen wird.

Gruppe 3: GOLGI nach Lichtexposition und Gold-Tonierung

Im lichtmikroskopischen Bild erscheinen die imprägnierten Zellen kontrastreicher als in den nicht-lichtexponierten Schnitten s. Gruppe 2 (Abb.3b). Im Emissionsspektrum findet man eine sehr hohe Emission für Gold. Als Kontrolle wurde eine Messung außerhalb der imprägnierten Zelle im benachbarten Neuropil vorgenommen. Hier zeigt das Spektrum weder eine Emission für Gold noch für Silber. Eine Emission für Uran ist im Spektrum nahe an der Emissionsstelle für Kalium erkennbar. Diese Uranemission kommt aus dem Uranylacetat , das für die Kontrastierung "en bloc" verwendet wurde.

Gruppe 4: GOLGI-Färbung, anschließend chemische Reduktion

Die imprägnierten Zellen sind im sekundären Elektronenbild im Material beider Varianten, die nach der chemischen Reduktion verarbeitet wurden, leicht zu lokalisieren. In der Umgebung der gut dargestellten Neurone sind zahlreiche Präzipitate deutlich außerhalb der Zelle zu beobachten.

Abb.2

Golgi-Originalverfahren. Hirnrinde der Ratte.
A.- Neuron durch den Aralditeinbettungsblock durch Transillumination fotografiert. In der unteren Hälfte des Bildes erkennt man den Zellkörper sowie den nach oben verlaufenden apikalen Dendriten. Im Hintergrund das Gefäßnetz. 160 X.

B.- Das Neuron "A" im Semidünnschnitt (0,5 µm). Im Zytoplasma beobachtet man Silberchromatkristalle. Der Kern enthält keine Kristalle. In der Nähe des Zellkörpers sind basale Dendriten angeschniten. Im oberen rechten Quadranten ist der apikale Dendrit zu sehen. Hellfeld. 360 X.

C.- Derselbe Schnitt wie "B" , jedoch im Dunkelfeld. 360 X.

D.- Drei Semidünnschnitte, vergleiche "B" und Darstellung desselben Neurons im REM. Die Pfeile zeigen die gleiche Golgi-gefärbte Nervenzelle. 73X.

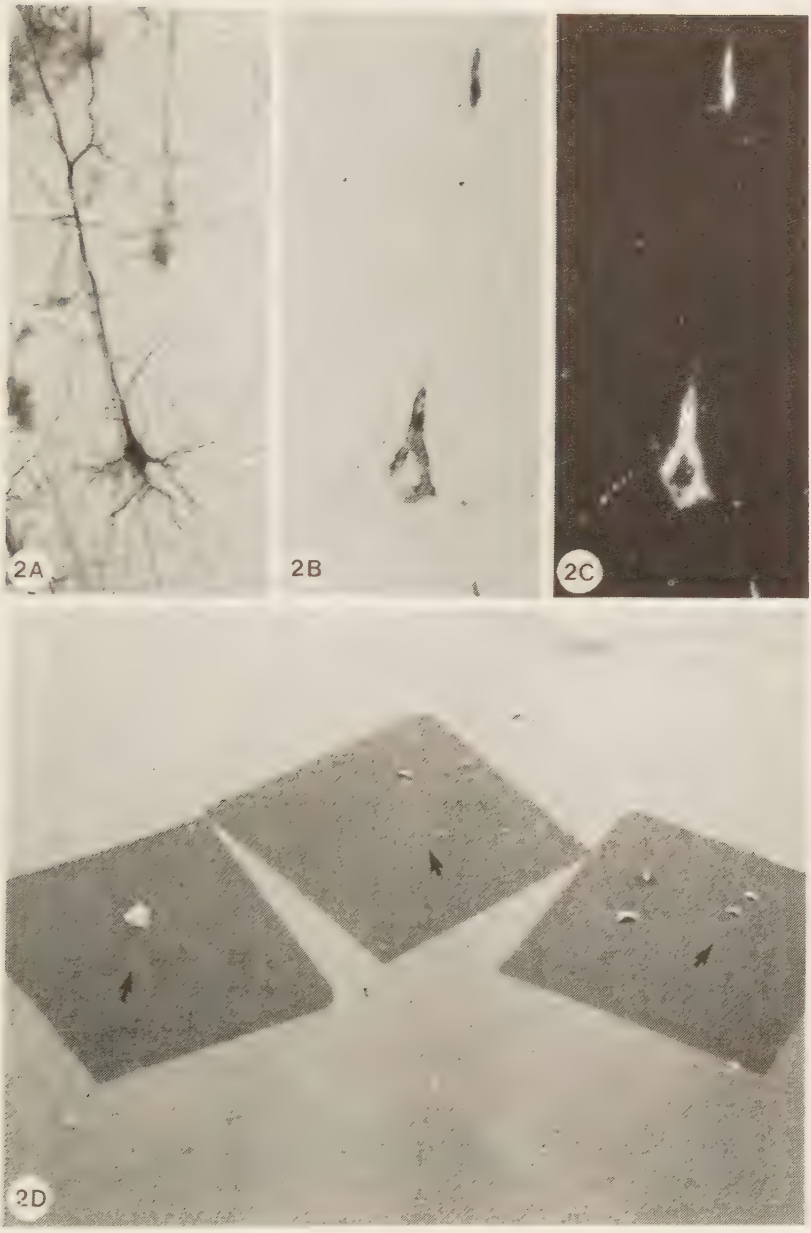

2A
2B
2C
2D

Abb. 3

Neurone der Hirnrinde nach verschiedenen De-Imprägnationsverfahren. Der apikale Dendrit ist in allen Abbildungen nach oben orientiert.
A.- Gold-Tonierung. Das Perikaryon erscheint blaß, die Dendriten dagegen kontrastreicher (Pfeil). 430X.

B.- Lichtexposition und Gold-Tonierung. Der Pfeil markiert das Neuron, das untersucht wurde. Vergleiche die Färbeintensität von Zellkörper und Dendriten mit Abb. 3A. 110 X.

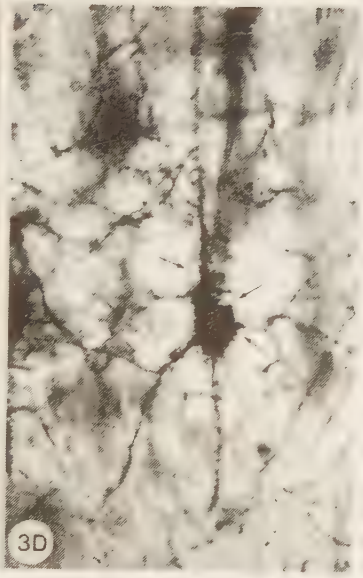
C.- Chemische Reduktion mit D 19-Kodak. Präzipitate umgeben die imprägnierte Zelle (Pfeil). 300 X.

D.- Chemische Reduktion mit D 19 gefolgt von Gold-Tonierung. Vergleiche mit Abb. 3 C. Die Färbung des Hintergrundes erscheint stärker.
—► = Präzipitate außerhalb der Zelle; 400 X.

3A

3B

3C


3D

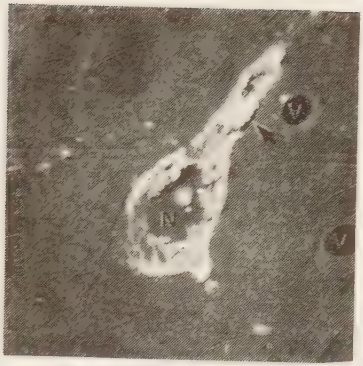
REM- Mikroanalyse von Plastikschnitten.

Abb. 4

Spektrum der " energy dispersive analysis", (im folgenden abgekürzt EDS) einer nach dem Golgi-Originalverfahren gefärbten Zelle.
REM-Bild: untersuchte Nervenzelle; N= Zellkern; V= Blutgefäße; Pfeil= Messungsstelle; Schnittdicke: 0,5 µm. 1100X.

Abb. 5

EDS-Spektrum einer nach dem Gold-Tonierung Verfahren de-imprägnierte Zelle.
REM-Bild: Der Pfeil zeigt die Messungstelle. Schnittdicke: 4 µm; 1100 X.



4

5

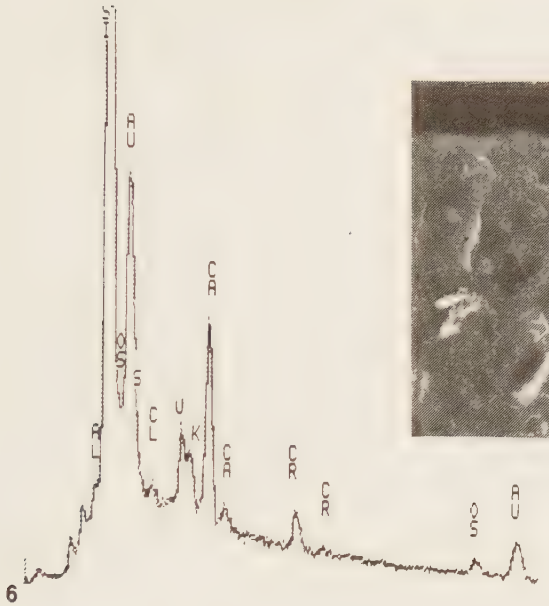
REM-Mikroanalyse von Plastikschnitten.

Abb. 6

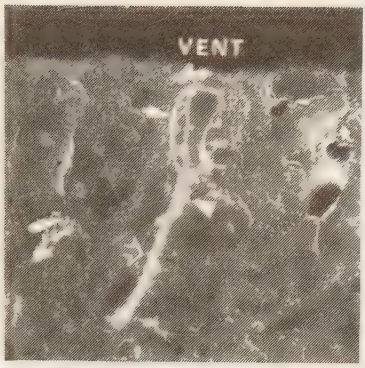
EDS-Spektrum eines nach Lichtexposition und Gold-Tonierung de-imprägnierten Tanyzyten.
REM-Bild: Tanyzyt des Hypothalamus. Vent = Ventrikel; ➔ = Perikaryon; ➪ = basaler Fortsatz; ▶ = Messungsstelle; Schnittdicke: 4 µm. 1100 X.

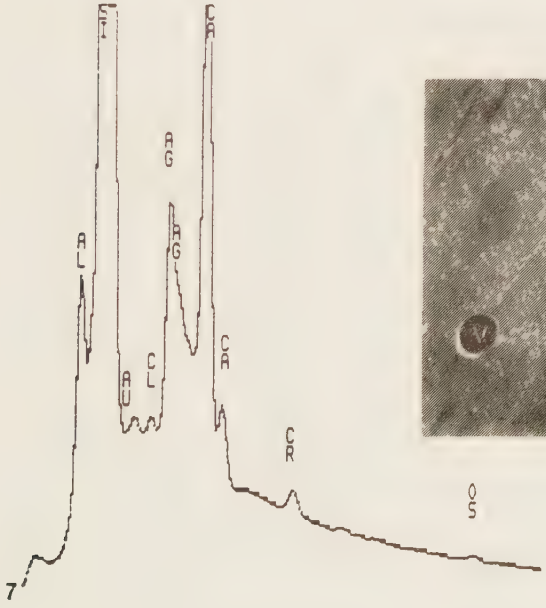
Abb. 7

EDS-Spektrum einer Zelle nach chemischer Reduktion mit D-19 Kodak.
REM-Bild: Nervenzelle, Kern und Zytoplasma können nicht deutlich untereinander ausgemacht werden. D = Dendrit; ➔ = extraneuronale Präzipitate; ⟶ = Plasmalemm ; ▶ = Messungsstelle im Dendrit; Schnittdicke: 0,5 µm. 1100 X.

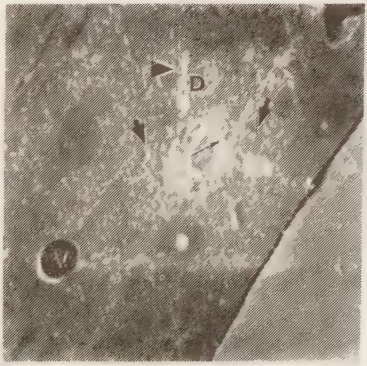


6





7



REM-Mikroanalyse von Plastikschnitten.

Abb. 8

EDS-Spektrum einer Zelle nach chemischer Reduktion mit D 19-Kodak und Gold-Tonierung.

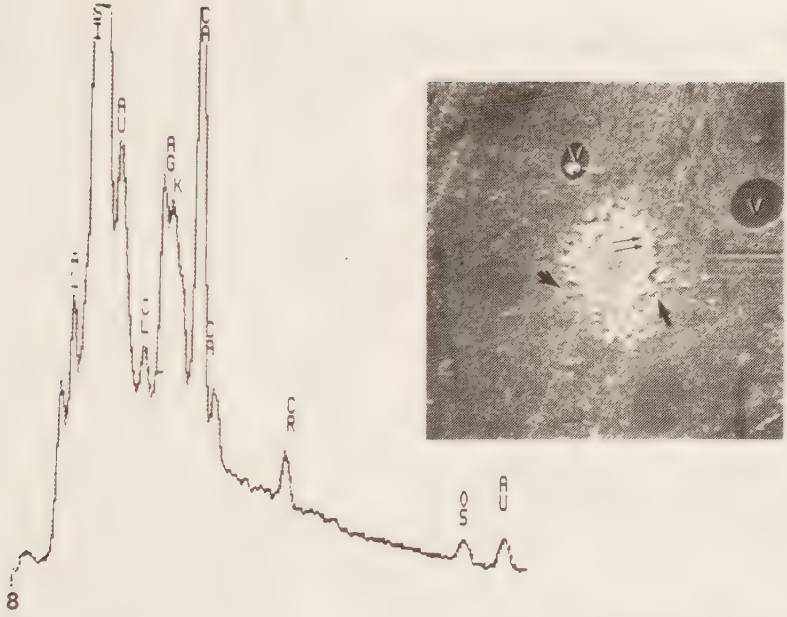
REM-Bild: Wie in Abb.7 ist die Kernmembran nicht differenzierbar. Die Pfeile ⇄ lokalisieren den vermutlichen Verlauf des Plasmalemms; → = Präzipitate außerhalb der Zelle. Schnittdicke : 0,5 µm. 1100 X.

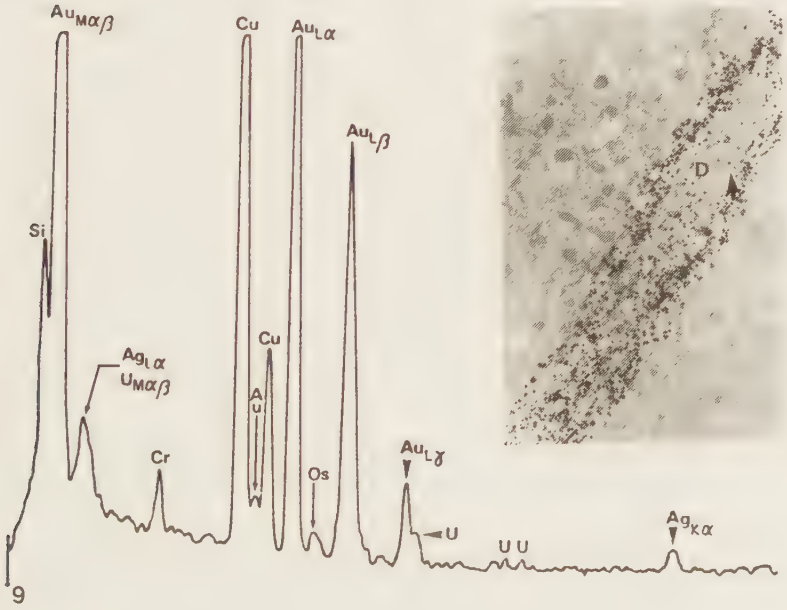
TEM-Mikroanalyse von Ultradünnschnitten.

Abb. 9

EDS-Spektrum von einem Dendriten einer Nervenzelle der Hirnrinde nach Gold-Tonierung. Rechts im Spektrum sieht man die Roentgenlinie K-alpha des Silbers. Die Linie L-alpha des Silbers erscheint weiter links, zusammen mit den Linien M-alpha und M-beta des Urans. Von links nach rechts sind die Linien M-alpha, beta und L-alpha, beta und gamma des Goldes zu sehen.

TEM-Bild; Meßstelle (Pfeil) = eines der feinen Präzipitate. Schnitt ohne Bleikontrastierung. 10000 X.


AU
AG K
CR
O S
A U
8
V
V


Au Mαβ
Cu
Au Lα
Au Lβ
Si
Ag Lα
U Mαβ
Cu
Au
W
Cr
Os
Au Lγ
U
U U
Ag Kα
9
D

4.2 Mikroanalyse von Ultradunnschnitten im Transmissionelektronenmikroskop

Gruppe 1: GOLGI-Imprägnierung o h n e De-Imprägnierung

In Dünnschnitten (s.Gruppe 1, REM-Studien) wurden Kristalle der GOLGI-imprägnierten Zellen untersucht. In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen, bei denen das Feinbereichbeugungsverfahren benutzt wurde, sind in diesen Kristallen Silber und Chrom nachgewiesen worden (s. Diskussion). Da diese Studie sich mit den sogenannten De-Imprägnierungsmethoden befaßt, wurde hier auf die aufwendige STEM-mikroanalytische Untersuchung verzichtet.

Gruppe 2: GOLGI-Imprägnierung m i t Gold-Tonierung

GOLGI-gefärbte Zellen, die nach dem Gold-Tonierung-Verfahren de-imprägniert wurden, zeigen ein sehr feinkörniges Präzipitat im Zytoplasma. Mengenmäßig enthalten die Dendriten mehr Präzipitat als die Perikaryen. Diese Unterschiede können schon am Lichtmikroskop bei Transillumination des Araldit blocks festgestellt werden (Abb. 3a). In der Abb.9 wird ein Dendritensegment mit sehr vielen feinen elektronendichten Präzipitaten gezeigt. Das Emissionsspektrum an dieser Stelle der imprägnierten Zellen zeigt das Vorhandensein folgender Elemente: Gold; von diesem Element findet man mehrere Röntgenlinien (Abb.9 u. 10), die als Beweis für eine sehr hohe Konzentration dieses Elements dienen. Silber ist ebenfalls vorhanden. Jedoch kann die Emission für Uran, (M-Linie), die unmittelbar rechts neben den L-Alphalinien auftritt, das Ablesen der Silberemission erschweren. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurde folgendes versucht:

1. es wurden Messungen außerhalb der imprägnierten Zelle in einer Zone des benachbarten Neuropils ohne Präzipitate vorgenommen.
2. Der eV-Bereich der Spektrumskala wurde vergrößert.

zu 1. - Man erkennt eine Emissionslinie für Uran und eine für Kalium, jedoch fehlt die Emission des Silbers links des Emissionskomplexes Uran-Kalium.

zu 2. - Durch die Vergrößerung der Skala wurde das Auftreten der Linie K-alpha 22109 eV festgestellt, was als Beweis für das Vorhandensein von Silber in einer Probe gilt (Abb. 9 u. 10). Im Spektrum des Materials, das nach dem GOLGI-Tonierung-Verfahren behandelt wurde, erscheinen neben Gold und Silber folgende Elemente: Silicium, Uran (schon erwähnt), Chrom, Kupfer und Osmium. Das Silicium ist kein Bestandteil des Präparates und somit für die Messungen nicht aussagekräftig; es könnte auf einer Kontamination des Mikroskops beruhen. Kalium, welches den Linien L-alpha,-beta,-delta Linien des Silbers im Spektrum sehr nahe liegt, könnte im Hinblick auf sein Erscheinen im Gewebe zwei Quellen haben; die eine ist das Gewebe selbst und die andere entstammt der chemischen Präparation des Gewebes, unter anderem während der Fixierung. Das Kupfer des Trägernetzes ist im Spektrum durch die Linien K-alpha und K-beta vertreten. Wenn der Elektronenstrahl in die Nähe der Balken des Trägernetzes kommt, steigt die Emissionsintensität des Kupfers. Schließlich erscheint Osmium, welches in der Impägnierungslösung vorkommt, im Spektrum in der Nähe der Linie M-alpha des Goldes und der Linie K-beta des Kupfers, aber auch in Form von einzelnen Emissionslinien. Zusammenfassend kann man sagen, daß in diesem Material die Präzipitate Gold und Silber enthalten. Die anderen Elemente, die im Spektrum auftreten, stellen Faktoren dar, die durch die Technik hinzukamen, ohne an der Zusammensetzung der Präzipitate beteiligt zu sein. Die Untersuchungsergebnisse der Präzipitate in anderen Zellen, z.B. der Astroglia, zeigen ähnliche Spektren.

Gruppe 3: GOLGI nach Lichtexposition u n d Gold-Tonierung

GOLGI-imprägnierte Zellen, die diesem Behandlungsverfahren unterzogen wurden, sind lichtmikroskopisch sehr kontrast-

reich(Abb.3b). Sie erscheinen grau-schwarz, was auf eine hohe Menge metallischer Präzipitate schließen läßt. Im Gegensatz zu den Zellen nach der GOLGI-Tonierung, treten nach Lichtexposition und GOLGI-Tonierung keine sichtbare Unterschiede im Imprägnierungsgrad zwischen Dendriten und Perikaryen auf. Die Abb.11 zeigt in einem Dendritensegment die Präzipitate, die eine für diese Verfahren typische Form, Größe und Lokalisierung in der Zelle besitzen. Diese Präzipitate wurden an mehreren Stellen mit der Mikrosonde untersucht; das EDS-Spektrum ergab dabei eine hohe Emission für Gold (Abb.11). Silber konnte in keinem der untersuchten Gebiete (Perikaryen, Dendriten, Präzipitate verschiedener Größe usw.) nachgewiesen werden. Messungen in Tanyzyten des Hypothalamus zeigen ein Spektrum mit denselben Merkmalen wie bei Nervenzellen der Hirnrinde (Abb.12a). Messungen in einer Markscheide aus der Nachbarschaft eines imprägnierten Tanyzyten dienten als Kontrolle. Das Spektrum zeigt keine Emission für Gold, aber weiterhin die Emission für die anderen Elemente, die in Zusammenhang mit Fixierung, Kontrastierung und Träger stehen (Abb.12b)

Gruppe 4: GOLGI-Methode reduziert (Behandlung mit einem Fotoentwickler, ohne oder mit Gold-Tonierung)

Die imprägnierten Elemente, nachbehandelt mit D 19, sind lichtmikroskopisch "tief schwarz". Im Gegensatz zu Gruppe 3 konnten keine Unterschiede der Imprägnierung zwischen Zellkörper und Dendriten festgestellt werden (Abb.3c). Die Abb.13 zeigt einen Dendriten mit dichtgelagerten Metallpräzipitaten in der Nähe der Plasmamembran. Im EDS-Spektrum der Präzipitate, inner- u. außerhalb der imprägnierten Zelle wurde nur Silber nachgewiesen.

Das mit D 19 behandelte Material, nachbehandelt mit Gold - Tonierung ist lichtmikroskopisch durch einen dunkleren Hintergrund gekennzeichnet. Viele Präzipitate umgeben die imprägnierten Elemente. Nach der Behandlung mit Gold weisen die Präzipitate Strukturveränderungen auf. Die größeren Präzipitate zeigen eine periphere Zone mit hoher Elektronen-

dichte, während sie in der zentralen Zone entweder leer sind oder nur einige zerstreute kleinere elektrondichte Partikel (Abb.14) enthalten. Die kleineren sind in der Regel kompakt. Bei der Durchführung von röntgen-mikroanalytischen Messungen in diesem Material wurden folgende Kriterien bei der Wahl der Meßstelle berücksichtigt:

1. Die Morphologie der Präzipitate
   (es wurden hierbei im Kern und in der Peripherie die Präzipitate analysiert)
2. Die zellbezogene Lokalisation der Präzipitate
   (es wurde im Zellkörper, in den Zellausläufern, extrazellulär und in außerhalb der imprägnierten Zellen liegenden Präzipitaten gemessen).

IM EDS-Spektrum konnte man eine starke Emission für Gold und Silber erkennen (Abb.14); wie in den anderen Gruppen erscheinen auch hier alle anderen begleitenden Elemente. Dies gilt für alle elektronendichte Zonen der Präzipitate. Messungen im Bereich des leeren Kerns für diese Metalle zeigen keine Emission. Diese Messungen können als Kontrolle für die anderen angesehen werden.

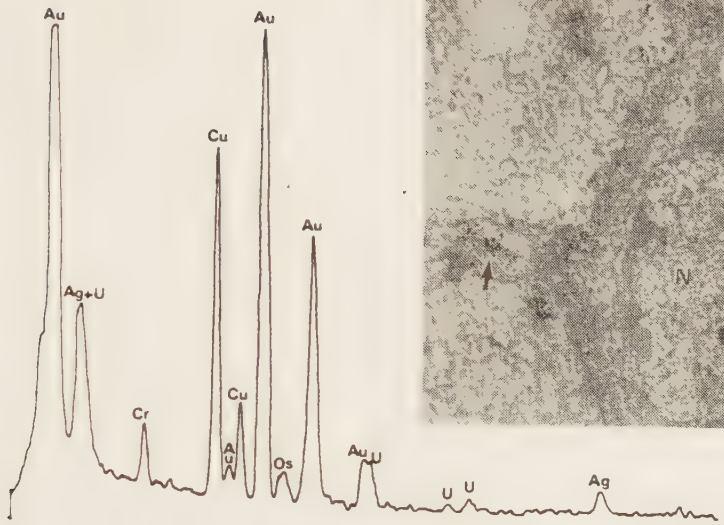
TEM-Mikroanalyse von Ultradünnschnitten.

Abb. 10

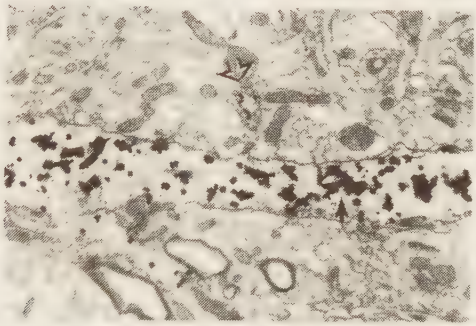
EDS-Spektrum einer Nervenzelle der Hirnrinde nach Gold-Tonierung..
TEM-Bild: Perikaryon und proximaler Abschnitt eines Dendriten.
N = Zellkern: Pfeil = Meßstelle; Schnitt ohne Bleikontrastierung.
2800 X.

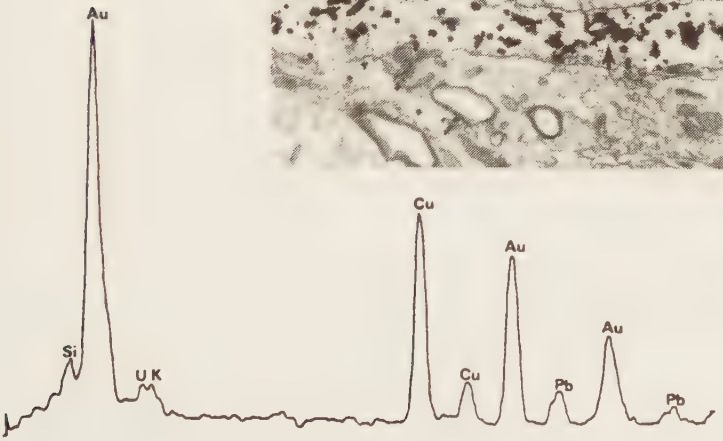
Abb. 11

EDS-Spektrum einer Zelle der Hirnrinde nach Lichtexposition und Gold-Tonierung.
TEM-Bild: Verzweigung eines Dendriten (siehe Folie).
⇨ = Dendritischer Dorn mit Metallpräzipitaten.
➔ = Meßstelle.
Bleikontrastierung. 12000 X.



10





11

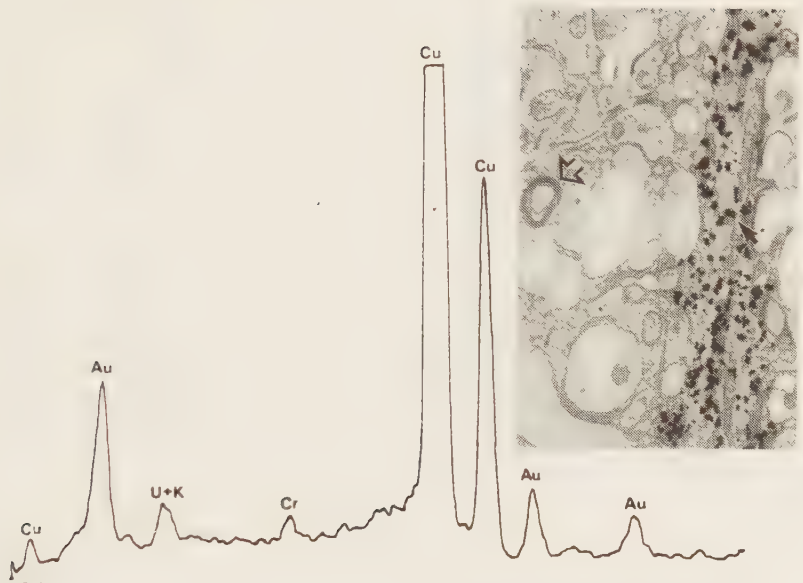
Abb. 12

TEM-Bild: Basaler Fortsatz eines Tanyzyten nach Lichtexposition und Gold-Tonierung. Schnitt ohne Bleikontrastierung. 13800 X.

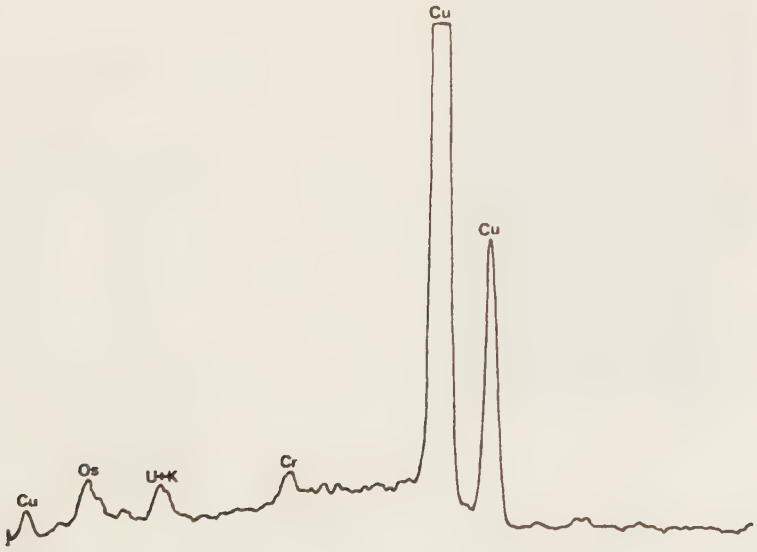
a) EDS-Spektrum. Meßstelle = ➔ .

b) EDS-Spektrum. Meßstelle = ⇨ .

Die Markscheide ist nicht imprägniert. Keine Emission für Gold.



12A



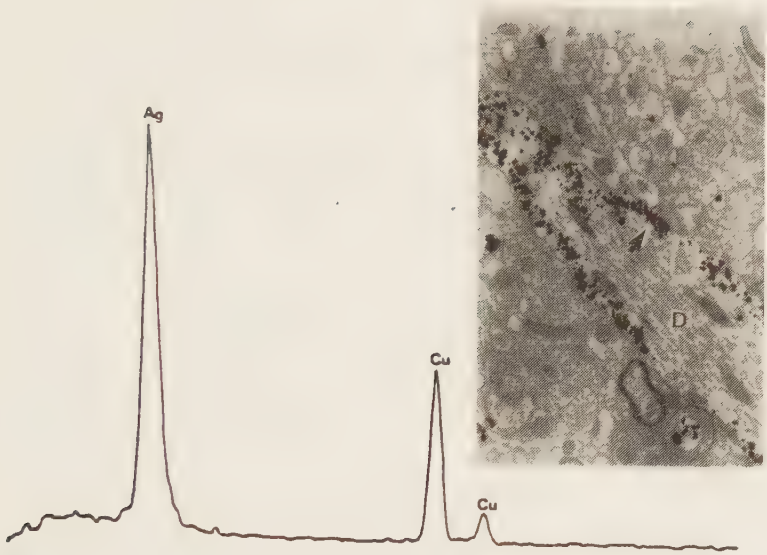
12B

Abb. 13

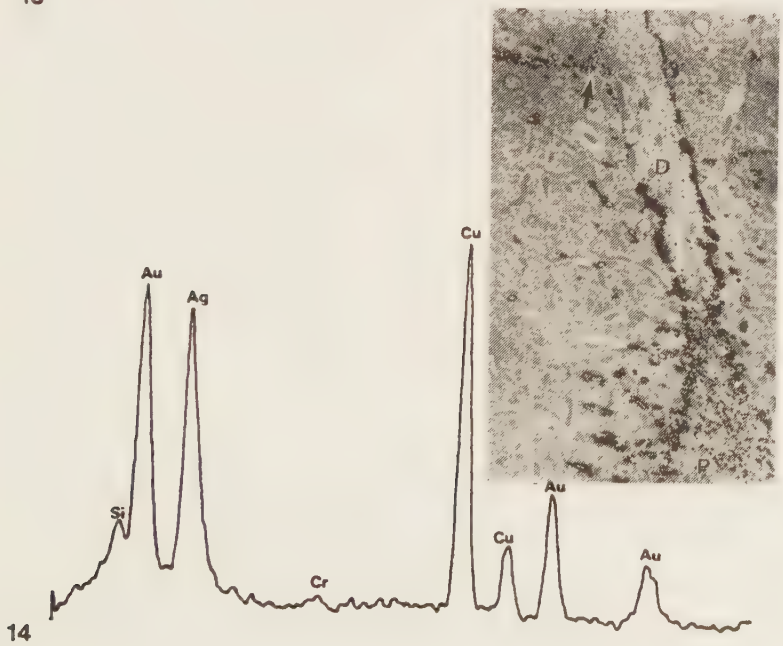
EDS- Spektrum eines Dendrits einer Nervenzelle der Hirnrinde nach chemischer Reduktion mit D 19-Kodak.
TEM-Bild: Außerhalb des imprägnierten Dendriten sieht man vereinzelte Präzipitate verschiedener Größe, die als Diffusionsartefakt gedeutet werden. ➨ = Meßstelle; Schnitt ohne Bleikontrastierung 12000 X.

Abb. 14

EDS-Spektrum des Dendriten einer Nervenzelle der Hirnrinde nach chemischer Reduktion mit D 19 und Gold-Tonierung.
TEM-Bild: Inner- und außerhalb der imprägnierten Zelle sind Präzipitate mit einem hellen Zentrum zu erkennen. Pfeil = Meßstelle.
Schnitt ohne Bleikontrast. 4800 X.



13



14

4.3 Die De-Imprägnierungsmethoden für GOLGI-EM: Vergleichende Studien

Nervenzellen im ZNS können mit Hilfe der De-Imprägnierungsmethode nach lichtmikroskopischer Charakterisierung vergleichend im TEM weiter untersucht werden. Diese kombinierte Untersuchung erlaubt die Erhebung von Daten sowohl der äußeren Struktur (Zellform, Dendritenmorphologie, dendritische Dornenverteilung, Axon und Axonkollaterale), als auch der inneren Gliederung desselben Neurons, wie Struktur und Umfang des endoplasmatischen Reticulums, die Anordnung anderer Organellen wie Mitochondrien, Lysosome, Einschlüsse, Zytoskelett sowie Zellkernstruktur unter besonderer Berücksichtigung der Kernmembran und Chromatinstruktur. Dies sind wichtige Parameter für eine weitere morphologische Charakterisierung und Typisierung eines Neurons. Mit Hilfe dieses Versuchsansatzes ist es ebenfalls möglich, die Qualität und Quantität der Zellkontakte zu erfassen, dann nämlich, wenn entweder der präsynaptische Teil imprägniert ist oder wenn der postsynaptische Teil die GOLGI-Färbung angenommen hat. Die vier in dieser Studie betrachteten Methoden haben eine Markierung der Nervenzellen zur Folge, die sich in der Morphologie und Menge der Präzipitate unterscheiden läßt. Es stellt sich die Frage, welche Variante der De-Imprägnierung für eine vergleichende GOLGI-EM Untersuchung gewählt werden soll. Um eine Wertung dieser Methoden durchzuführen wurden folgende Parameter berücksichtigt:

- Form der Präzipitate
- Größe der Präzipitate
- Lokalisation und Verteilung innerhalb der imprägnierten Zellen
- Diffusion außerhalb der imprägnierten Zellen
- Darstellungsmöglichkeit verschiedener Neuronen und Gliazelltypen

- Erhaltung der Ultrastruktur
- Artefakte, insbesondere bei der Ultramikrotomie

Diese Methoden wurden an Nervenzellen der Hirnrinde, der Kleinhirnrinde (Purkinje-Zellen) sowie Gliazellen der Grausubstanz in der Hirnrinde und Tanyzyten des Hypothalamus durchgeführt.

Gruppe 1: Mit dem GOLGI-EM Verfahren (direktes Verfahren) behandeltes Material

Die nach diesem Verfahren imprägnierten Nervenzellen sind im Ultradünnschnitt entweder mit Silberchromatkristallen gefüllt oder weisen Löcher auf, die dadurch entstehen, daß beim Schneiden die Präzipitate im Wasser des Glasmessertroges aufgelöst oder mechanisch vom Platz bewegt werden (Abb.15). Über die Form und Größe der Präzipitate ist nur schwer eine Aussage zu machen. In der Regel sind die Kristalle untereinander so verwachsen, daß von einer vergleichbaren Form nicht gesprochen werden kann. (Abb.2b) Enthält die Zelle zu viele Präzipitatkristalle, maskieren oder verdecken sie fast vollständig das Zytoplasma (Abb.15a). Vor allem in der Peripherie der Zelle ist eine Strukturanalyse kaum möglich. Im Gegensatz dazu kann man Zellkontakte, die auf der Zelloberfläche sitzen, z.B. Synapsen, gut erkennen (Abb.15a). Sowohl die Mitochondrien als auch der Zellkern sind frei von Metallpartikeln; bis zu einem gewissen Grad wären in diesen Bereichen der Zelle Aussagen über deren Struktur zulässig (Abb.15). Die von "Löcher" durchsetzten Zellen, bei denen während der Präparation die Präzipitate offensichtlich verloren gingen, sind für eine zytologische Studie nicht geeignet. Durch Randeffekte in der Nähe der Löcher ist keine gute TEM-Auflösung möglich; aus diesem Grunde eignen sich diese Schnitte weniger zur Betrachtung als solche, in denen die Präzipitate verbleiben. Bei starker Vergrößerung kann man die sich auf Zellausläufern befindenden Zellkontakte (Synapsen) gut erkennen. Eine Betrach-

tung des postsynaptischen Anteils ist kaum möglich, weil die innere Struktur des Dendriten weitgehend beschädigt ist (Abb.15a).

Gruppe 2: Mit dem GOLGI Gold-Tonierung (nach FAIREN) behandeltes Material

Die nach diesem Verfahren imprägnierten Zellen enthalten Präzipitate, die kleiner sind als diejenigen anderer De-Imprägnierungsverfahren (Abb.16). Diese Präzipitate sind rund und können von der Größe her in zwei Kategorien eingeordnet werden:
Die kleineren mit einem Durchmesser von 2o nm und die größeren mit einem Durchmesser von 50 nm. In der Regel erscheinen diese Präzipitate isoliert, können aber ab und zu in Form von Aggregaten aus mehreren Partikelelementen auftreten. Hierbei kann man wiederum zwischen kleineren und größeren Aggregaten unterscheiden. Die ersteren haben einen Durchmesser von 90 nm, die zweiten einen von 120 nm. Bei den angegebenen Partikelgrößen handelt es sich um Durchschnittswerte aus 150 Einzelmessungen.
Es wurde bereits auf die unterschiedliche Menge von Präzipitaten in Dendriten und Perikaryen hingewiesen (Abb.3a). Im Perikaryon sind die Partikel besonders häufig unterhalb des Plasmalemms zu finden, dünn verteilt aber auch in tieferen Bereichen des Zellkörpers (Abb.10 u.16). Im Bereich der Nissl-Schollen liegen die Partikel in Nähe der Zytomembranen, die Zisternen des endoplasmatischen Reticulum bleiben jedoch frei. Dabei ist eine Betrachtung der Polysomen und membrangebundenen Ribosomen möglich. Andere Organellen, z.B. Mitochondrien, enthalten keine Präzipitate. Im Zusammenhang mit dem Zytoskelett konnte kein direkter Bezug zwischen Filamenten und Mikrotubuli festgestellt werden. An Mikrotubuli angelagerte Metallpartikel können beobachtet werden, freie Partikel werden aber auch in den Maschen des zytoskelettären Netzwerkes gefunden (Abb.9 u.16).

Die Erhaltung der Ultrastruktur ist im Allgemeinen sehr gut. Es werden keine Veränderungen an den Organellen, am Kern, am Chromatin und an der Weite des Interzellularraumes gesehen.

Mit dem GOLGI-Verfahren wurden in unseren Präparaten aber auch Gliazellen gefärbt. Vor allem konnten vollständige Darstellungen von Astrozyten des protoplasmatischen Typs und Tanyzyten beobachtet werden. Die Astrozyten zeigen nach der Gold-Tonierung nach wie vor ihre typische profilreiche Gestalt. Die Konturen der Zellausläufer erscheinen durch zahlreiche dichtgelagerte Ausstülpungen der Zelle unscharf. Diese Beobachtung trifft auch auf die perivaskulären Fortsätze dieser Zellen zu (Abb.17). Die Perikaryen besitzen meist eine glattwandige Form, insbesondere Kontaktstellen mit Blutgefäßen. Die Präzipitate zeigen dieselben morphologischen Charakteristika, wie sie bei den Neuronen beschrieben wurden. Sie sind in der Zelle nicht uberall gleichmäßig verteilt. Im Zytoplasma des Zellkörpers gibt es Zonen, die frei von Präzipitaten sind. Die Organellen, wie Mitochondrien und Gliosomen, enthalten keine Partikel. Die Gliofilamente, die in Form dicker Bündel auftreten, werden von den Partikeln umgangen, das Innere bleibt frei (Abb.17b). Trotz unterschiedlicher Behandlung ist die charakteristische Dicke der intermediären Filamente (IF) gut zu erkennen; sie beträgt nach unseren Messungen 10 nm. Im Zellkern werden keine Partikel beobachtet. Auch die Struktur des Chromatins ist im Vergleich zu nicht imprägnierten Präparaten unverändert (Abb.17). In den Zellausläufern findet man kleine und große Partikel (s.o.). Normalerweise werden die feinsten (ca. 20 nm) in sehr dünnen Kollateralen der Fortsätze beobachtet. Die größeren (ca. 50 nm) kommen vor allem in Fortsätzen größeren Durchmessers vor (mehr als 3 µm) ohne Zusammenhang mit der Existenz eines Zytoskeletts.

Die Tanyzyten des ventralen Hypothalamus sind durch die GOLGI-Methode intensiv gefärbt. Die für die Identifizierung der Zellen charakteristischen Merkmale konnten bereits vor der De-Imprägnierung mit Gold lichtmikroskopisch beobachtet werden. Die Merkmale sind die Form des Zellkörpers, der basale Fortsatz sowie der proximale Halsabschnitt, der sich durch zahlreiche, kurze und seitlich gerichtete Ausläufer von dem glatten, basalen Fortsatz unterscheiden läßt. Nach der Gold-Tonierung findet eine vollständige De-Imprägnierung der Tanyzyten statt. Die Zellen sind nach dem Einwirken des Goldchlorids noch sichtbar; nach der Fixierung mit Natrium-Thiosulfat entfärben sie sich jedoch so schnell, daß eine nachfolgende Untersuchung im TEM nicht mehr möglich ist.

Gruppe 3: Lichtexposition und Gold-Tonierung

Nach der Anwendung dieser Methoden-Variante zeichnen sich die GOLGI-gefärbten Nervenzellen lichtmikroskopisch durch einen deutlichen Kontrast aus (Abb.3b). Sie enthalten mehr Präzipitate. Die Partikel der Metallpräzipitate sind größer. Zwei lassen sich unterscheiden: Die kleineren Partikel mit einem Durchmesser von 40 nm und die größeren mit einem Durchmesser von 100 nm. Sehr häufig aggregieren diese Partikel und bilden unregelmäßig gestaltete Präzipitate, bei denen die Messung der Partikelgröße sehr schwierig ist (Abb.18). Im Ultradünnschnitt ist auch ohne numerische Quantifizierung eine höhere Konzentration von Partikeln pro Areal zu beobachten als an vergleichbaren Orten der Gruppe 2. Die Verteilung der Partikel in der Zelle ist mehr oder weniger gleichmäßig; die Unterschiede zwischen Dendriten und Perikaryon kommen in diesem Material nicht vor (s.o. Abb.3a u.3b). Man kann gelegentlich einige einzelne Präzipitate in der Matrix der Mitochondrien beobachten (Abb.19 u. 20). Wie in Gruppe 2 sind die Zellkerne frei von Präzipaten. In den Dendriten der Hirnrindenneurone lassen sich die Präzipitate bis in die feinsten Verzweigungen und in die dendritischen Dornen verfolgen (Abb.19 u. 20).

Untersuchungen mit den De-Imprägnierungsmethoden wurden auch an der Kleinhirnrinde durchgeführt. Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung fallen vor allem die Purkinje-Zellen auf. Sie unterscheiden sich deutlich von den Neuronen der Großhirnrinde. Während die kortikalen Neurone mehr "schwarz" erscheinen, zeigen die Purkinje-Zellen eine hellere Färbung. Diese Beobachtungen deuten auf eine unterschiedliche Qualität in der Imprägnation mit dem Silberchromat hin. Trotzdem konnte nach der Lichtexposition und der Gold-Tonierung kein Unterschied in der Qualität des Präzipitats ausgemacht werden. Jedoch sehen die Purkinje-Zellen nach diesem Verfahren kontrastreicher aus (Abb.25). Im Ultradünnschnitt beinhalten diese Zellen weniger Präzipitate als die Neurone der Hirnrinde (Abb.21b). Möglicherweise beruhen diese Unterschiede auf der ursprtünglich schwächeren Silberchromatfärbung der Purkinje-Zellen. Im Perikaryon werden nur vereinzelte Partikel beobachtet (Abb.25). In den Dendriten, im Bereich der Molekularschicht, liegen die Präzipitate vor allem peripher (Abb.26). Die Feinstruktur der imprägnierten und der nicht imprägnierten Elemente ist gut erhalten. Vor allem zeigen die Parallelfasern und die Bergmannsche-Glia trotz langdauernder chemischer Behandlung keine Strukturveränderung (Abb.26). In der Versuchsgruppe 3 können in den Astrozyten ähnliche Eigenschaften wie in Gruppe 2 (nach der Gold-Tonierung) beobachtet werden. Hinsichtlich Größe und intrazellulärer Verteilung der Partikel wurden keine wesentlichen Unterschiede festgestellt (Abb.21). Die Tanyzyten sind nach der Lichtexposition stabiler, vergleicht man sie mit der De-Imprägnierung und nachfolgender Gold-Tonierung. Sie sind daher im Präparat gut erkennbar. Die Abb. 22a zeigt einen noch ungeschnittenen Tanyzyten des Hypothalamus im Araldit-Block. Vom gleichen Tanyzyten, in Serie geschnitten, stammen die Abbildungen 22b, 23, 24a, welche Details dieser Zelle zeigen. Lichtmikroskopisch läßt sich der Zellkörper gut von dem basalen Fortsatz unterscheiden (Abb.22a).

Das Perikaryon enthält den Zellkern; es ist von geringer Größe. Im Bereich des basalen Fortsatzes ist ein proximaler Abschnitt erkennbar, der als "Hals" bezeichnet wird und der eine sehr unregelmäßige Oberfläche besitzt. Kennzeichnend dafür sind zahlreiche kurze Ausstülpungen. Der distale Anteil des basalen Fortsatzes zeigt eine glatte Oberfläche; daher erscheint diese Struktur scharf konturiert (Abb22a).
Im TEM-Bild befinden sich feine Präzipitate in allen Bereichen der imprägnierten Zelle. Sie sind relativ gleichmäßig verteilt. Im Perikaryon werden die Präzipitate nicht nur in den feinsten Mikrovilli der apikalen Zelloberfläche, sondern auch in den Interdigitationen beobachtet (Abb.22b u. Abb.24b). Im Hals des basalen Fortsatzes können die durch die Präzipitate markierten Zellausstülpungen bis in das benachbarte Neuropil verfolgt werden (Abb.23a). Die morphologische Analyse der Zellkontakte wird durch die Imprägnierung nicht nachteilig beeinflußt. Im apikalen Teil der Tanyzyten können die Desmosomen der Zonulae adhaerentes gut erkannt werden (Abb.22a). An tiefer gelegenen Abschnitten des Zellkörpers findet man gap junctions in Form von zirkulären Nexus (Abb.24b). Der innere Raum eines zirkulären Nexus zeigt eine geringere Elektronendichte als das umgebende Zytoplasma des markierten Tanyzyts. Im Bereich des basalen Fortsatzes werden keine Nexus beobachtet, jedoch gap junctions (Abb.24a). Die Erhaltung der Feinstruktur in den imprägnierten Tanyzyten zeigt im Vergleich zu den nicht-imprägnierten keine nennenswerte Veränderungen (Abb.23a).

Gruppe 4: GOLGI-Färbung, anschließend chemische Reduktion

Lichtmikroskopisch sind die imprägnierten Zellen nach der Einwirkung von D 19 ohne oder mit zusätzlicher Gold-Tonierung sehr kontrastreich. Im TEM-Bild fällt die Menge an Präzipitaten auf, die mit dem lichtmikroskopischen Bild in Einklang stehen. Zahlreiche Präzipitate können in unmittelbarer Nähe der imprägnierten Zellen beobachtet werden. Ein Bezug auf spezielle Strukturen wird jedoch nicht beobachtet (Abb.27).

Im TEM-Bild zeigen die Partikel nach der Einwirkung von D 19 eine Größe, die zwischen 50 und 120 nm variiert. Unmittelbar unter der Zellmembran befinden sich neben großen, einzelnen Präzipitaten auch Aggregate, die zum Teil einen Durchmesser von 360 bis 540 nm erreichen. Im übrigen Zytoplasma werden sehr feine, staubartige Präzipitate beobachtet, die im Durchschnitt kleiner als 50 nm sind. Im Gegensatz zu den anderen Versuchsgruppen lassen sich auch in den Mitochondrien hin und wieder Präzipitate nachweisen. Im Zellkern sind Anhäufungen von Präzipitaten ohne Beeinträchtigung der Kernhülle nachweisbar (Abb.27b). Die Präzipitate, die ungleichmäßig verteilt in der Umgebung einer dargestellten Zelle vorkommen, zeigen dieselben Charakteristika wie die intrazellulär lokalisierte Präzipitate, haben aber keinen sichtbaren Bezug zur Struktur der Zellausläufer oder des Neuropils (Abb.27b). In den Zellen, welche nur mit D 19 entwickelt sind, wurden regelmäßige Löcher zwischen der Araldítschicht und dem Präzipitat beobachtet. Möglicherweise sind diese Partikel sehr hart und wurden beim Schneiden verschoben. Sie sind möglicherweise ein Artefakt (Abb.27a). Im Neuroplasma der Dendriten sind die Partikel staubähnlich. Die Frage, ob Artefakt oder nicht, stellt sich nicht. Die größeren Präzipitate außerhalb der Zelle gleichen denen im Inneren der Zelle (Abb.27b).
Nach der Gold-Tonierung zeigen die mit D 19 reduzierten Partikel Strukturveränderungen. Sie sind aufgelockert, zum Teil porös. Die Blöcke lassen sich aber problemlos schneiden. Charakteristisch für das Material ist das sehr häufige Auftreten von leer erscheinenden Kernen im Innern der zahlreichen Präzipitate (Abb.14 u. 28). Das Verteilungsmuster dieser Partikel ist dasselbe wie in den nur mit D 19 behandelten Schnitten. Aufgrund der Interpretationsprobleme, die in dieser Gruppe hinsichtlich der Größe, der Verteilung im Gewebe usw. der Präzipitate auftraten, verzichteten wir auf die Untersuchung der Gliazellen. Die Diffusion der Präzipitate um die imprägnierten Gliazellen war so auffällig, daß

ein Vergleich der lichtmikroskopischen mit den elektronenmikroskopischen Befunden keine weitere Information erwarten ließ.

Abb. 15

Verschiedene Anschnitte desselben Neurons (Hirnrinde) gefärbt nach dem Golgi-Originalverfahren ohne De-Imprägnierung. Alle Schnitte ohne Bleikontrastierung.

A.- Dendrit; * = " Löcher", die chemisch oder physikalisch "herausgelöste" Silberchromatkristalle hinterlassen haben. N = Kern einer Gliazelle. 8800 X.

B.- Schnitt nit zahlreichen erhaltengebliebenen Kristallen, im Bild dunkel. 7260 X.

C.- Schnitt, in dem sich die Kristalle abgelöst haben ("Löcher"). 8700 X.

Außerhalb der imprägnierten Zelle ist die Struktur gut erhalten.

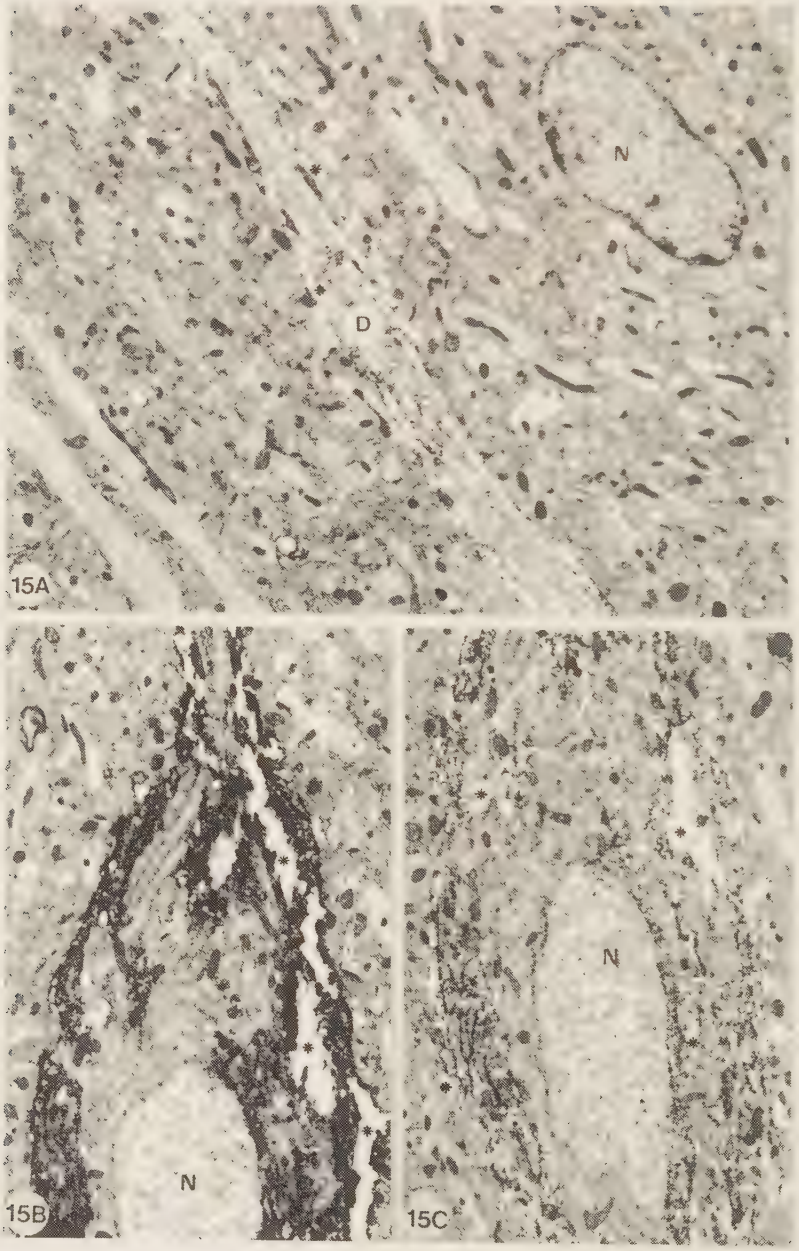

N
D
15A
N
15B
N
15C

Abb. 16

Neuron der Hirnrinde nach Gold-Tonierung. Feine Präzipitate sind unterhalb des Plasmalemms zu sehen. N = Zellkern des Neurons; db = " dense bodies"; m = Mitochondrien.
Schnitt mit Bleikontrastierung. 5800 X.

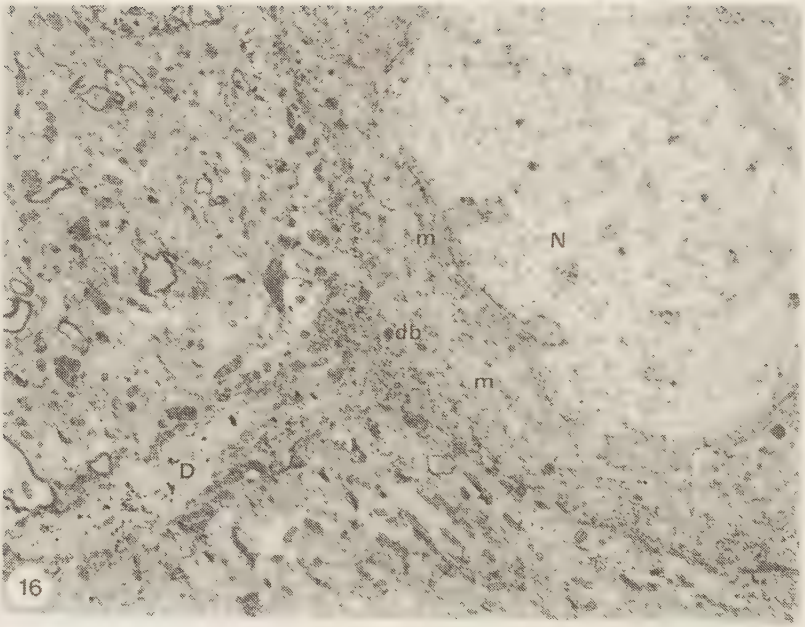
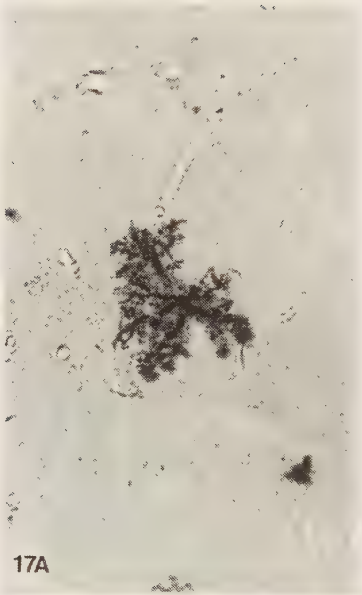

m
N
db
m
D
16

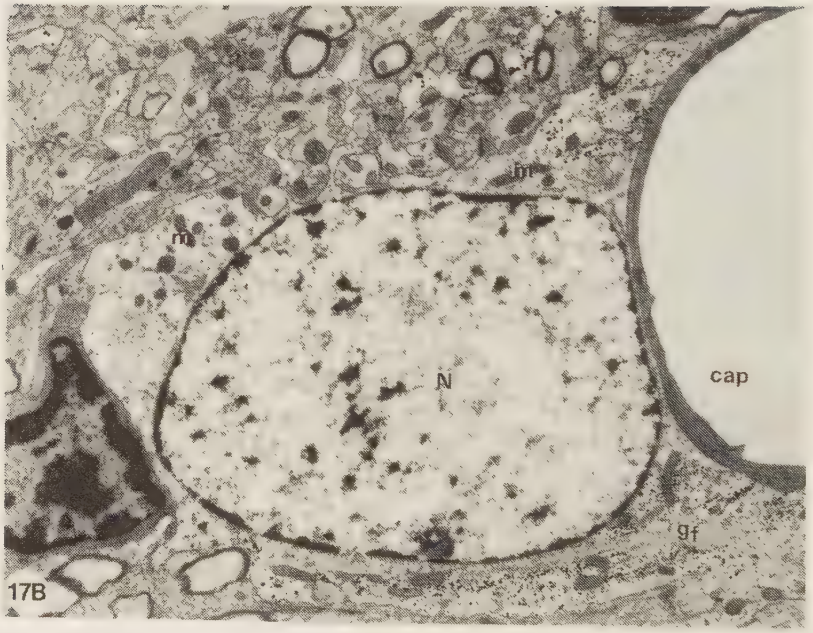
Abb. 17

Protoplasmatischer Astrozyt der Hirnrinde nach Gold-Tonierung.
A.- Aufnahme im Aralditeinbettungsblock vor dem Schneiden. Im Hintergrund das Kapillarnetz. 380 X.

B.- Derselbe Astrozyt wie in "A" in einem Ultradünnschnitt. Zellkörper mit Kern (N) in engem Kontakt mit einer Kapillare (cap). Präzipitate in mehreren Bereiche der Zelle. gf = Gliofilamente. Schnitt mit Bleikontrastierung. 10000 X.



17A



17B

Abb. 18

Neuron der Hirnrinde nach Lichtexposition und Gold-Tonierung.
Die Präzipitate im Zytoplasma sind gleichmäßig verteilt. In der perinuklären Zone ist die Menge der Präzipitate sehr gering.
nuc = Nukleolus; Schnitt mit Bleikontrastierung. 5500 X.

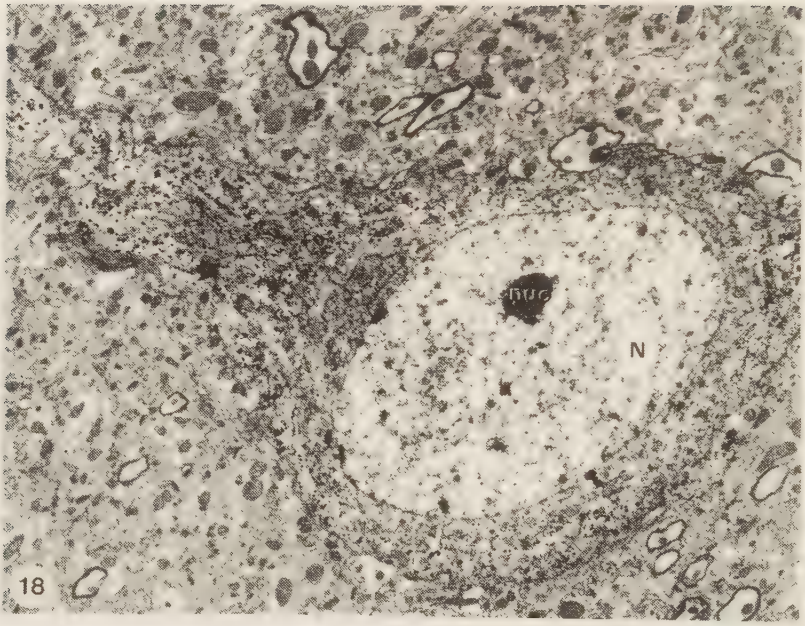

nuc
N
18

Abb. 19

Verzweigung eines apikalen Dendriten der Hirnrinde nach Lichtexposition und Gold-Tonierung.
Die Präzipitate sind teilweise aggregiert, ohne daß die Feinstruktur verändert ist. Es wird auf die Struktur des angrenzenden Neuropils hingewiesen. Schnitt mit Bleikontrastierung. 9000 X.

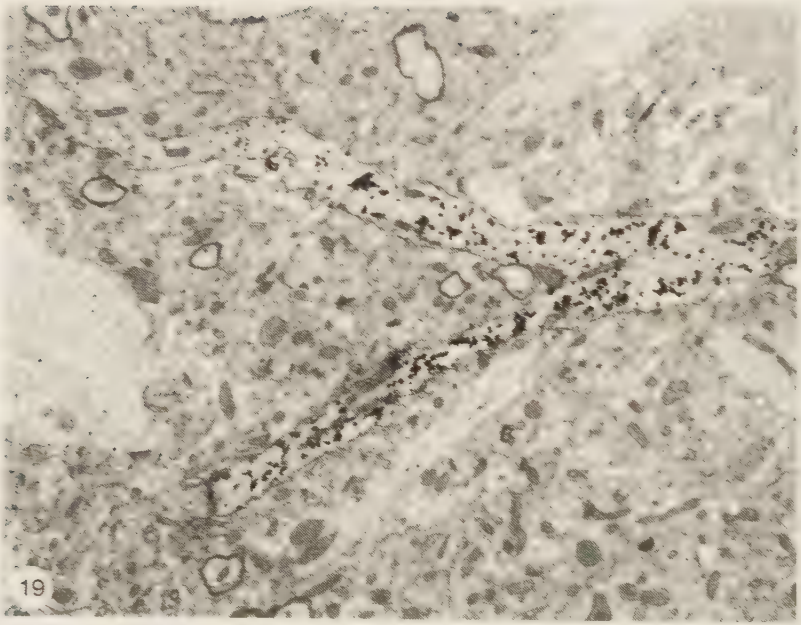

19

Abb. 20.

Anschnitt eines Dendriten der Hirnrinde nach Lichtexposition und Gold-Tonierung.
Die Präzipitate sind teilweise mit den Mikrotubuli ➔ vergesellschaftet, kommen aber auch in Form von unregelmäßige Aggregaten vor.

⇨ = Dendritischer Dorn mit Präzipitate im Hals. Der synaptische Kontakt kann deutlich erkannt werden.
Schnitt mit Bleikontrastierung. 25000 X.

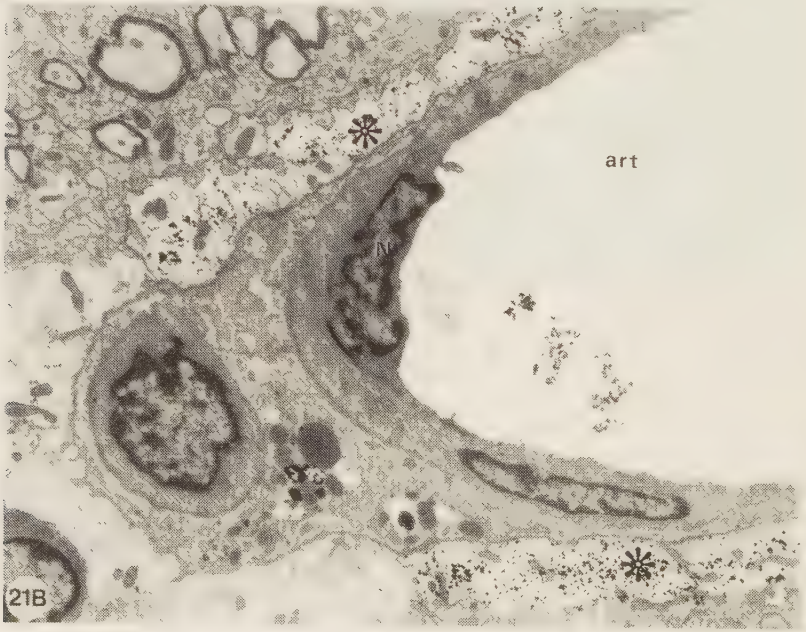
m
m
20

Abb. 21

Perivaskulärer Astrozyt der Hirnrinde (s. auch Abb. 18) nach Lichtexposition und Gold-Tonierung.

A.- Der Astrozyt ➡ umgibt eine Arteriola (art). Lichtmikroskopische Aufnahme des Araldithblocks vor dem Schneiden. 270 X.
B.- TEM-Bild desselben Astrozyts (A).
* = gliale Fortsätze. In der Gefäßwand erkennt man eine Endothelzelle mit Kern (N), die Muskelschicht sowie Teile eines Perizyts sind auch erkennbar. Schnitt mit Bleikontrastierung. 6800 X.

21A



21B

Abb. 22

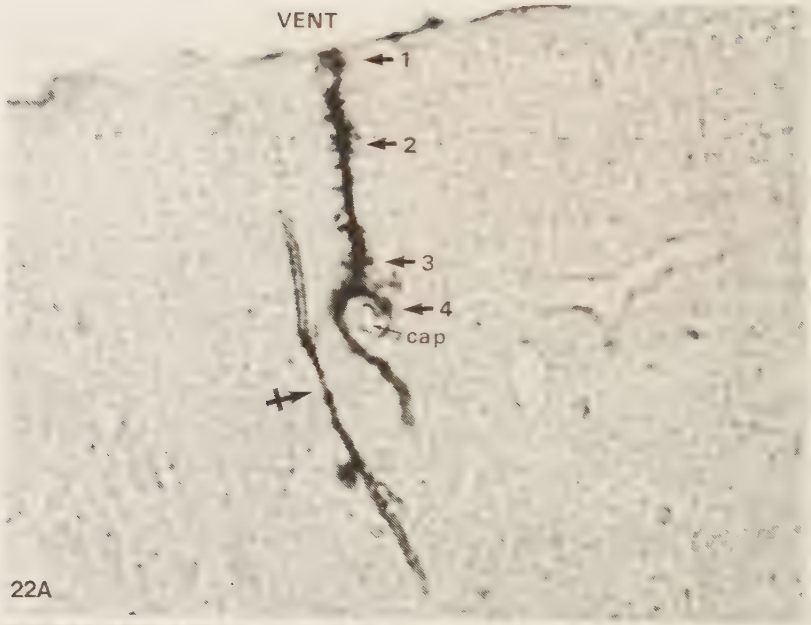
Tanyzyt des Hypothalamus nach Lichtexposition und Gold-Tonierung.

A.- Lichtmikroskopische Aufnahme im Araldite einbettungsblock vor dem Schneiden.

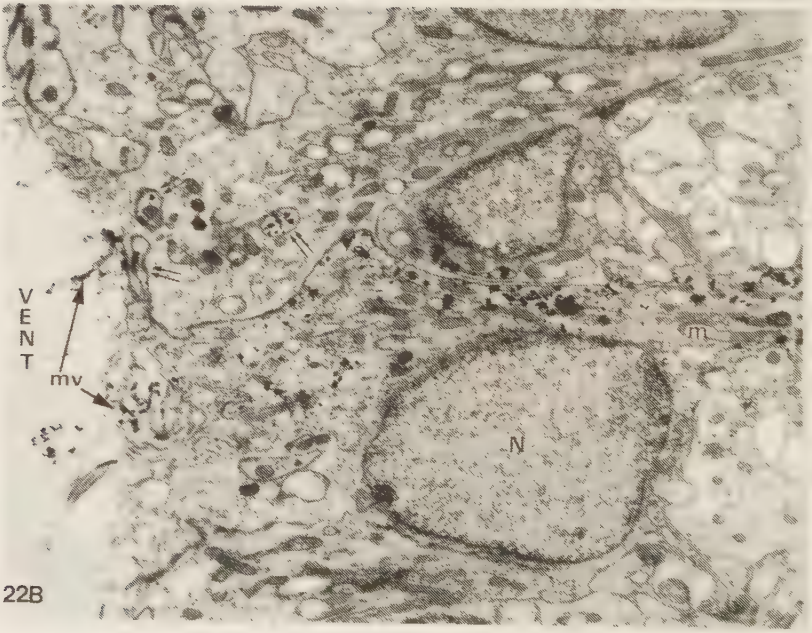
1.: Zellkörper; 2.: Hals; 3 und 4.: Bereich in der Nähe einer Kapillaren (cap). ⟶ = basaler Fortsatz eines anderen Tynyzyts. 700 X.

B.- TEM-Bild aus der Schnittserie des Tanyzyts (Abb. 22 A). Schnitt im Bereich des Zellkörpers mit Zellkern und apikalem Pol sowie Austritt des basalen Fortsatzes.

mv = Mikrovilli; ⇄ = Interdigitationen mit Desmosomen . Schnitt mit Bleikontrastierung. 10500 X.



22A

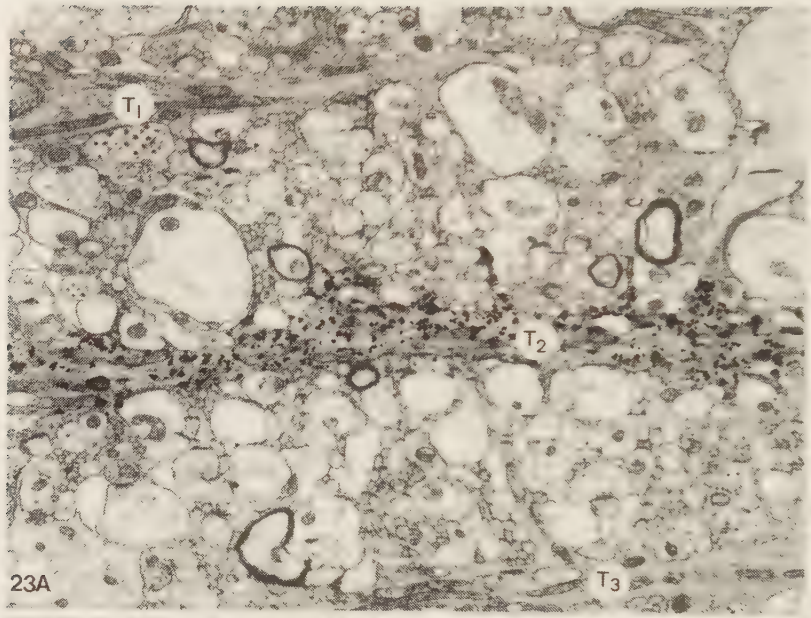


22B

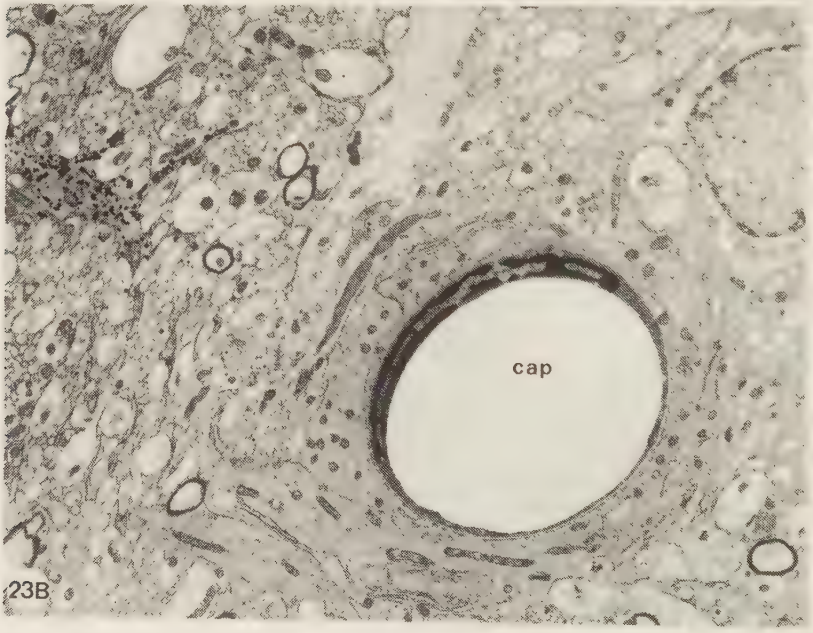
Abb. 23

A.- Schnitt aus dem Bereich 2. T2 Hals des imprägnierten Tanyzyts von Abb. 22 A; T1 und T3 nicht imprägnierter benachbarter Tanyzyten. Die Präzipitate markieren die seitlichen Ausstülpungen des Tanyzyts im Neuropil.
Schnitt mit Bleikontrastierung. 11200 X.

B.- Abschnitt 3 des Tanyzyts der Abb. 22A . Der basale Fortsatz verläuft perivaskulär, bildet aber keine Gefäßfüße aus.
Schnitt mit Bleikontrastierung. 8800 X.



23A



23B

Abb. 24

A.- Abschnitt 4 des Tanyzyts der Abb. 22 A. In dieser Ebene ist ein Gefäßfuß des Tanyzyts in Kontakt ⟶ mit der Kapillaren;
➡ = Großflächiger "gap junction".
Schnitt mit Bleikontrastierung. 13800 X.

B.- Golgi Imprägnierung nach Lichtexposition und Gold-Tonierung. Perikaryon eines Tanyzyts mit Interdigitationen. ➡ lange interdigitierende Ausläufer mit Präzipitaten. * = zirkulärer Nexus. 14500 X.

cap
24A

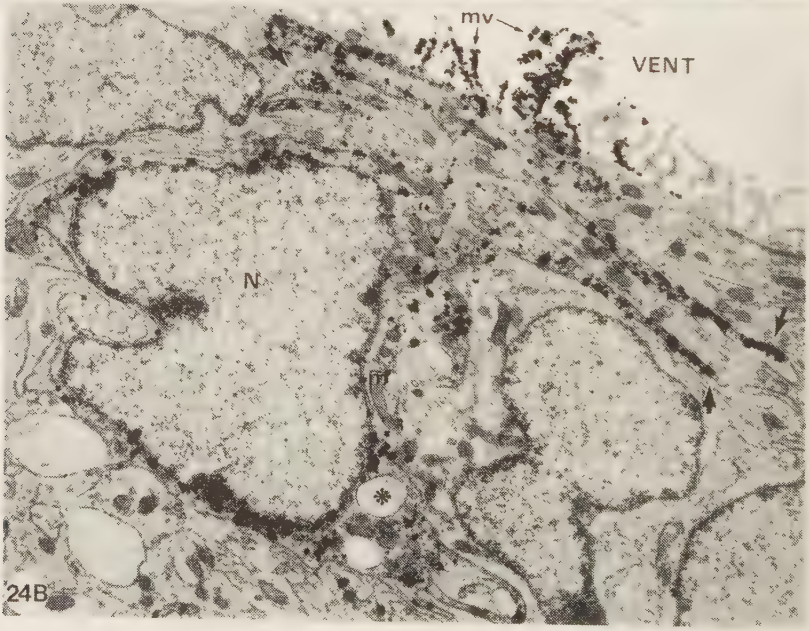
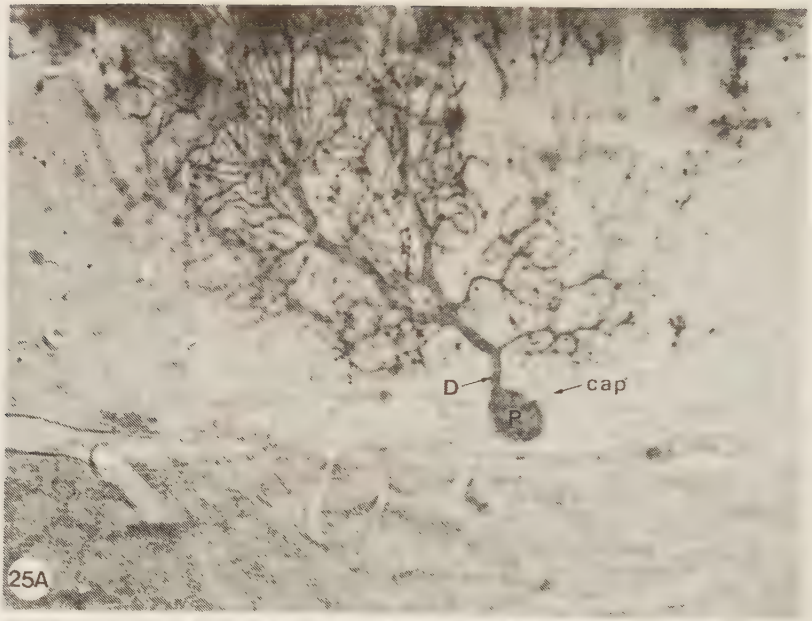

mv
VENT
N
24B

Abb. 25

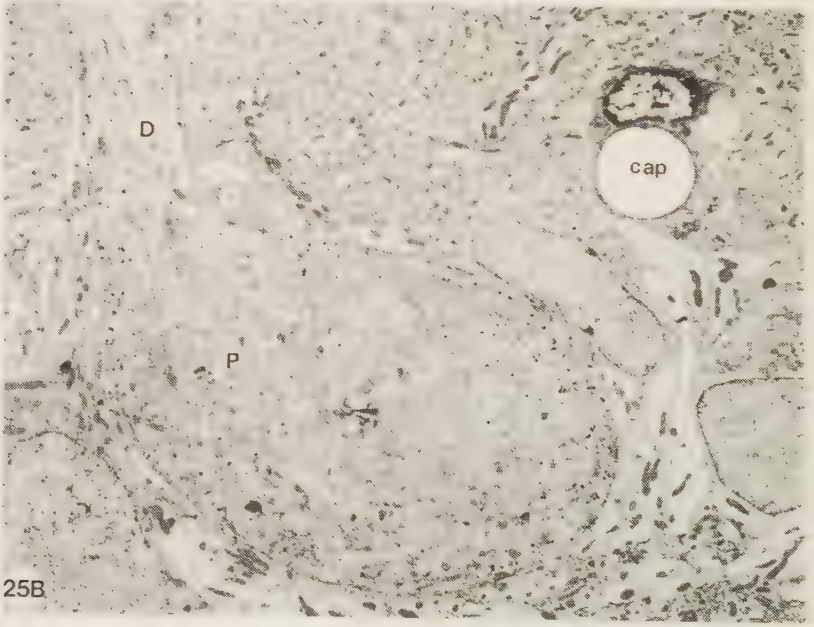
Kleinhirnrinde, Golgi-Imprägnation nach Lichtexposition und Gold-Tonierung.

A.- Lichtmikroskopische Aufnahme einer Purkinje-Zelle im Araldite einbettungsblock vor dem Schneiden. Man kann den dentritischen Baum und das Perikaryon (P) erkennen. Ein weiterer Orientierungspunkt für die Identifizierung der Zelle in den Schnittserien kann die Kapillare neben dem Zellkörper sein.
D = Hauptdendrit; 390 X.

B.- TEM-Bild des Perikaryons der Zelle in Abb. 25 A. Vergleiche den Umriß des Perikaryons mit der Form der Zelle in Abb. 25 A. Wenige Präzipitate sind zu sehen. (cap) und (D) dienen als Orientierung um die Zelle zu erkennen. 4000 X.



25A



25B

Abb. 26

Kleinhirnrinde. Golgi-Imprägnation nach Lichtexposition und Goldtonierung.

Ausschnitt eines sekundären Dendrits aus der Zelle von Abb. 25 A.

Beachte die Strukturerhaltung im imprägnierten Dendrit.

➨ = Zytoskelett; Neuropil = untere Hälfte des Bildes.

Bündel von parallelfasern zwischen Dendrit und Kapillaren. 6500 X.

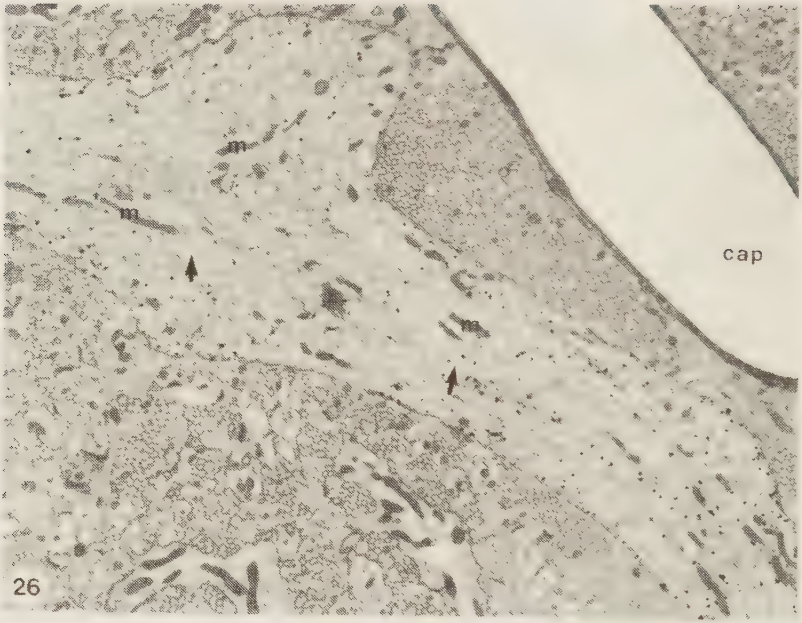

cap
m
m
m
26

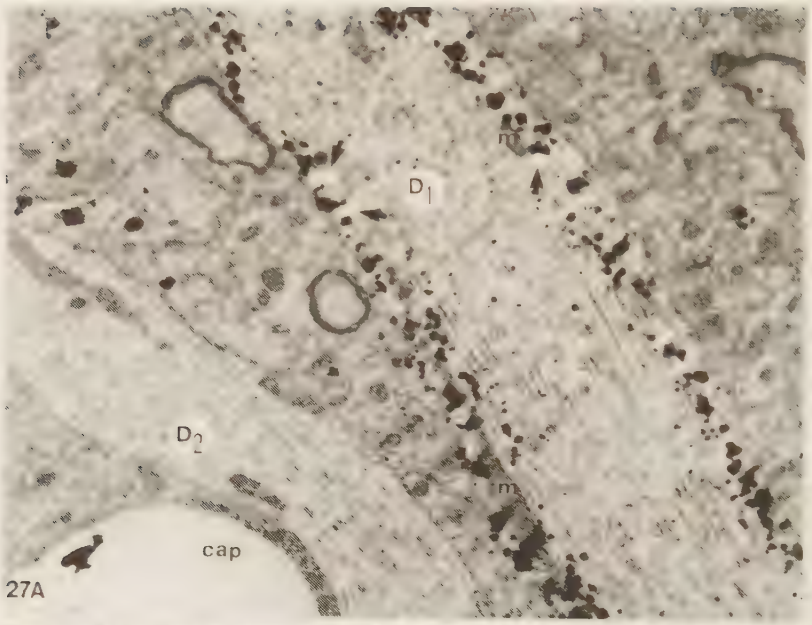
Abb. 27

Neuron der Hirnrinde. Golgi-Imprägnation nach chemischer Reduktion mit D 19-Kodak.

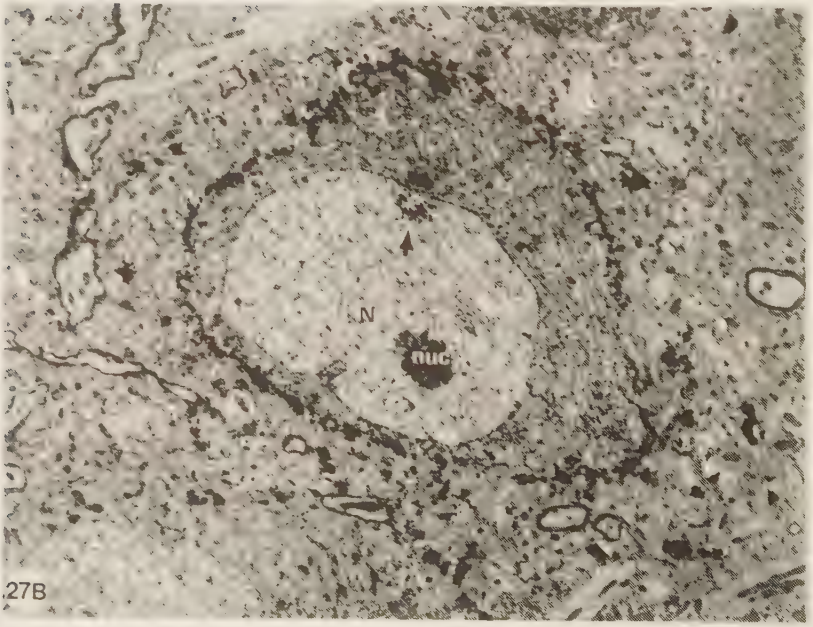
A.- Imprägnierter Dendrit (D1). Präzipitate unmittelbar unterhalb der Zellmembran; sie erscheinen kompakt. Einige Artefakte im Araldit sind häufig zu finden (➔). Nicht imprägnierter Dendrit (D2). Die Mitochondrien können Präzipitate enthalten. 17500 X.

B.- Ubersicht des Perikaryons einer imprägnierten Nervenzelle nach D 19- Reduktion.

Die Präzipitate sind vor allem am Plasmalemm zu finden, aber auch im Zellkern (➔). Im Neuropil außerhalb der Zelle sieht man ebenfalls Präzipitate, die als Diffusionsartefakte gelten. 5400 X.



27A

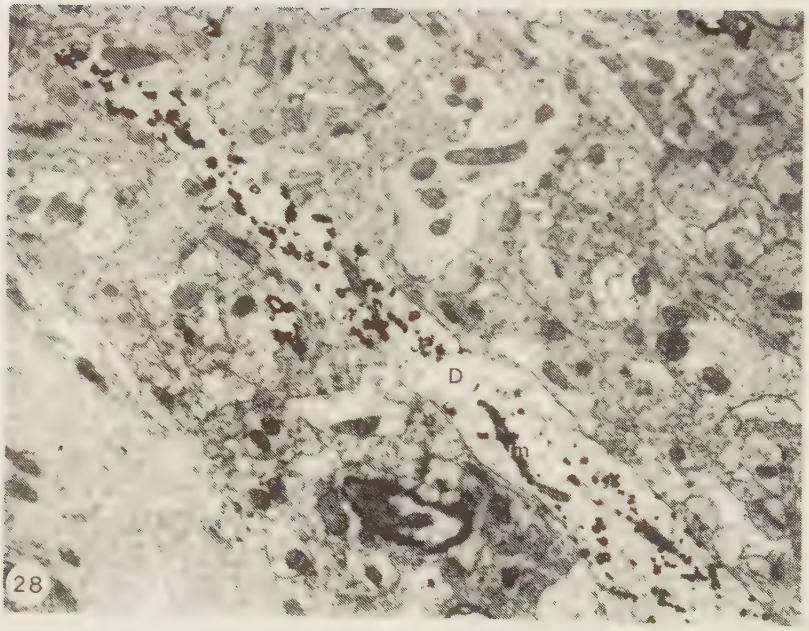


27B

Abb. 28

Neuron der Harnrinde. Golgi-Imprägnierung nach chemischer Reduktion mit D 19 und Gold- Tonierung.

D = Dendrit mit typischen, hohlen Präzipitaten. Die Mitochondrien enthalten zahlreiche Partikel. Wie in Abb. 27 sind auch hier Präzipitate außerhalb der Zelle vorhanden. 17000 X.


D
m
28

5. DISKUSSION

Die chemische Grundlage der GOLGI- Methode (1873) basiert auf der Bildung von Silberchromatkristallen in den Zellen des Nervensystems. Fast hundert Jahre nach der Entdeckung dieser Methode trugen FREGESLEV et al. (1971) zum ersten Mal Daten über die Struktur und chemische Natur der Reaktionsprodukte zusammen, die bei Anwendung des GOLGI-Verfahrens in den imprägnierten Nervenzellen entstehen. Die Autoren konnten mit Hilfe der Feinbereichelektronenbeugung beweisen, daß in den GOLGI-Präzipitaten nur ein Chromderivat vorkommt, nämlich Silberchromat in Kristallform. Diese Befunde wurden auch mit der DEBYE-SCHERRER-Feinbereichelektronenmikroskopie bestätigt (CHAN-PALAY, 1973). In der vorliegenden Arbeit wurde die energiedispersive Röntgenmikroanalyse (EDS-Mikroanalyse) angewandt, um die elementare Zusammensetzung der GOLGI-Präzipitate zu ermitteln.
Die EDS-Mikroanalyse wurde schon früher eingesetzt, um Metalle in ionisierter oder reduzierter Form im Nervengewebe nachzuweisen (HACKNEY u. ALTMAN, 1983). Unser Studium der Literatur ergab, daß diese Arbeit die erste ist, in der das GOLGI-Verfahren mit der EDS-Mikroanalyse untersucht wurde.

Zur Theorie der Mikroanalyse

Das Prinzip der Röntgenmikroanalyse beruht darauf, daß jedes Element ein eigenes Energiespektrum besitzt. Jeder Atomkern ist von Elektronenbahnen mit jeweils definiertem Energiebereich umgeben. Diese werden mit den Buchstaben K,L,M,N usw. bezeichnet. Ein Elektron, das auf ein Atom stößt, kann das Herausspringen eines Elektrons aus einer der Bahnen verursachen (Ionisierung). Dadurch entsteht eine Lücke in der entsprechenden Elektronenbahn, die sofort durch den Transfer eines Elektrons aus einer äußeren, d.h. energiereicheren Bahn, ersetzt wird. Bei diesem Transfer wird eine Röntgenstrahlung freigesetzt, die für jedes Atom eine spezi-

fische Energie hat. Die Besonderheit des Röntgenspektrums (EDS-Spektrum) resultiert aus der Anordnung der Energiebereiche in jedem Element.

Bei der Untersuchung eines Präparates im Elektronenmikroskop wird dieses mit Elektronen beschossen; dadurch entstehen Röntgenstrahlen. Die Größe des Gebietes, das die Röntgenstrahlen erzeugt, ist vom Durchmesser des Elektronenstrahls abhängig; dieser kann wiederum mit der Kondensorlinse gesteuert werden. Gleichzeitig kann man mit der EDS - Mikroanalyse das Präparat beobachten und dabei die Dimensionen und Lage der zu analysierenden Stelle bestimmen. Für unsere Untersuchung bedeutet dies, auch von der Möglichkeit der morphologischen Betrachtung Gebrauch machen zu können.

Die Mikrosonde setzt die Inputs in elektrische Signale um, die dann durch einen Rechner weiter verarbeitet werden. Es entstehen hierbei Histogramme der Röntgen-Spektren aller Elemente, die im Präparat vorhanden sind. In der Abszisse werden die Strahlenenergien in Elektronenvolt (eV) dargestellt. In der Ordinate ist die Anzahl der Emissionen, die für jeden Energiebereich des Spektrums aufgenommem wurden, angezeigt. Neben der Röntgenstrahlung entsteht ein Hintergrund, welcher in direktem Zusammenhang mit der Dicke des Präparates steht (CHANDLER, 1977).

Bei der Bestimmung eines Elementes mittels einer Mikrosonde können zwei Schwierigkeiten auftreten:

1. Das untersuchte Element kann im Spektrum durch starke Emissionen eines anderen Elementes mit ähnlicher Energie (eV) verdeckt werden.
2. Ein Element kann eine sehr starke Emission zeigen; dabei wird der Hintergrund erhöht und kann somit die Erkennung schwacher Emissionen anderer Elemente sehr erschweren.

Durch die Kombination von REM und RTEM mit der EDS-Mikroanalyse konnten in unseren Untersuchungen diese Schwierigkeiten weitgehend vermieden werden.

Zur Präparation des Materials:

Bei der mikroanalytischen Auswertung biologischen Materials ist es notwendig, auf die Strukturerhaltung des Materials und die chemische Form zu achten, in welcher das Element, das man untersuchen möchte, im Gewebe vorkommt. Lösliche Elemente, d.h. die nicht gebunden sind, werden in unterschiedlichen Mengen und anders verteilt erscheinen, wenn das Gewebe vor der Untersuchung mit organischen Lösungsmitteln oder wässrigen Lösungen behandelt wurde (CHANDLER, 1977). In unseren Untersuchungen spielten diese Schwierigkeiten keine Rolle, da Gold und Silber zumeist in reduzierter Form, d.h. unlöslich, vorhanden ist. Wie die lichtmikroskopische Untersuchung ergab, verändert eine Entwässerung mit Äthanol sowie die Einbettung in Epoxyharz in keiner Weise die Färbung der imprägnierten Zellen. Es traten keine bemerkenswerte Verluste an Präzipitaten bei diesen Vorbereitungsvorgang ein. Der Grund, die Präparation unseres Materials für die EDS-Mikroanalyse nicht zu verändern, war die den Originalrezepten folgende exakte Anwendung der GOLGI-EM-Methoden. Obwohl die Kontrastierung des Gewebes mit Uranylacetat für den Nachweis von Silber Schwierigkeiten bereiten kann, wurde auf dieses Hilfsmittel für die morphologische Untersuchung des Materials nicht verzichtet.

Zu der Zusammensetzung der Präzipitate:

In dem Gewebe, das nach dem GOLGI-Verfahren imprägniert wurde, bilden sich in den Zellen Präzipitate, die aus Silberchromat bestehen (FREGESLEV et al., 1971). Unsere Ergebnisse mit der Mikrosonde bestätigen diese Befunde. Es wurden starke Emissionen für Silber und Chrom registriert, die auf eine hohe Konzentration dieser Elemente in den Präzipitaten schließen lassen. Dagegen kann man über die reduzierte oder ionisierte Form, unter welcher Silber und Chrom auftreten, keine Aussage machen (CHANDLER, 1977).

In unseren Untersuchungen wandten wir das Rezept des GOLGI--Verfahrens an, wie es bei VALVERDE (1970) beschrieben wurde. Andere Varianten sind lediglich Modifikationen der Konzentration der Chemikalien (Kaliumdichromat, Osmiumtetroxid, Silbernitrat) und/oder der Verweildauer der Gewebe in den verschiedenen Lösungen (s. MOREST, 1981). Trotzdem läßt sich feststellen, daß die Präzipitate, die sich dabei bilden, auch aus Silberchromat zusammengesetzt sind (CHAN--PALAY u. PALAY, 1972). Untersuchungen über den Kristallisationsvorgang während der Versilberung im GOLGI-Verfahren haben einen Zusammenhang zwischen der Form der Kristalle und der Darstellung von Axonen gezeigt (BRAITENBERG et al., 1967). In diesen Untersuchungen wurden Daten über die Bildungsgeschwindigkeit bei der Kristallisation erhoben. Die Kristalle können auf freien Oberflächen mit einer Geschwindigkeit von 160-330 µm/Std. wachsen. Faktoren, wie die Konzentration des Kaliumdichromats oder der Saccharose als Zusatz, beeinflussen diese Prozesse sehr stark. Für die Elektronenmikroskopie hat man diese Erfahrungen ausgenutzt und GOLGI-Varianten entwickelt, die die Bildung sehr kleiner Kristalle ermöglichen (RIBI u. BERG, 1980). Auch in diesem Fall kommen dieselben Elemente in den Präzipitaten vor.

In anderen GOLGI-EM-Methoden werden die Silberchromatkristalle durch die Einwirkung von Chemikalien (Ammoniumnitrat, Natriumsulfid, Ammoniak) verändert. In dieser Gruppe sind Veränderungen in der Zusammensetzung der Präzipitate möglich. BLACKSTAD (1970) führte das Ammoniumnitrat und das Natriumsulfid ein. Vor allem wegen der starken Diffusion der Präzipitate ist die Anwendung der beiden Reagenzien bald verlassen worden. Durch Auslaugen (BRAAK u. BRAAK, 1982) werden die Präzipitate relativ klein, wahrscheinlich deshalb, weil sich ein Teil des Silberchromats löst, oder weil es sich in Silberoxid umbildet, welches bei einem pH von 7.0 unlöslich ist.

Ähnliche Effekte kann mit dem Natriumhydroxid erreicht werden (RAMON-MOLINER, 1985). Bezüglich der Zusammensetzung der Präzipitate wird das Silber weiterhin in diesen daraus resultierenden elektronendichten Partikel enthalten sein, während das Chrom mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die Bildung von Chromaten oder anderen Chrom-Derivaten abgewaschen wird. Für die Elektronenmikroskopie stehen andere Methoden zur Verfügung, bei denen das Silber des Silberchromats durch ein anderes Metall ersetzt wird. Erste Versuche in Richtung der Metall-Substitution wurden zunächst mit Bleiderivaten, Bleinitrat und Bleilactat durchgeführt (RAMON-MOLINER u. FERRARI, 1972,1976). Diese Methoden wurden jedoch vor allem wegen der mangelhaften Strukturerhaltung wieder aufgegeben. Versuche mit Goldchlorid dagegen haben zu der Entwicklung einer sehr ausgereiften GOLGI-EM-Technik geführt (FAIREN et al., 1977). Nach diesen Autoren soll das Silber durch Gold ersetzt werden, so daß am Ende des Vorganges die Zellen Goldpartikel enthalten. Nach unseren Befunden enthalten die GOLGI-imprägnierten Zellen nach der Goldchloridbehandlung nach FAIREN Präzipitate, in denen beide Elemente, Gold und Silber, vorkommen. Da keine Unterschiede in der Zusammensetzung der Präzipitate, unabhängig von der Lokalisation in der Zelle, gefunden wurden, ist die Hypothese berechtigt, daß diese Reaktion mit dem Goldchlorid nach FAIREN gleichmäßig in der gefärbten Zelle abläuft und zu keiner vollständigen Substitution führt. Aus der Höhe der Emissionen im Spektrum kann man entnehmen, daß diese Partikel wesentlich mehr Gold als Silber enthalten. Obwohl die Emission für Silber schwach ist, besteht kein Zweifel an unserer Diagnose. Im EDS-Spektrum, insbesondere bei den REM-Messungen, kommt es zu einer gewissen Überlappung der Emission von Silber, Uran und Kalium. In diesem Bereich des Spektrums befinden sich die L-Linien des Silbers. Die Linien Ag L-beta$_1$ und Ag L-beta$_2$ überlappen sich jeweils mit U M-alpha und U M-beta.

Die Linie Ag L-gamma ist weitgehend durch die starke Emission des Kaliums verdeckt. Unmittelbar links von diesem Linienkomplex befindet sich die Linie Ag L-alpha, die sich mit keiner anderen überlappt; sie ist somit von entscheidender Bedeutung für den Nachweis von Silber in diesen Proben in der REM-Mikroanalyse. In der TEM-Mikroanalyse ist neben dem Erscheinen der Linie L-alpha auch die Linie Ag K-alpha von Bedeutung. Sie gilt als eindeutiger Beweis für das Vorhandensein von Silber in einer Probe (CHANDLER, 1977; BASSEMIR u. STRAUSFELD, 1983). In Anbetracht der relativ gleichmäßigen Partikelgröße und des Emissionsverhältnisses für Gold und Silber in diesem Material wurde an eine Quantifizierung der mikroanalytischen Daten gedacht. Die Studien von CHAN-PALAY u. PALAY (1972) haben gezeigt, daß die Färbung der GOLGI-imprägnierten Zellen von der Menge der Silberchromatkristalle abhängig ist. Darüberhinaus hat die Form der Kristalle, die filamentös und lamellär sein kann, einen Einfluß auf die farbliche Erscheinung der imprägnierten Zellen. Dies alles bedeutet, daß das Material, auf welches das Goldchlorid bei der De-Imprägnierung einwirken soll, von Zelle zu Zelle mengenmäßig unter mehreren Aspekten sehr variieren kann. Für die quantitative Analyse ist es daher sehr wichtig, daß das EDS-Spektrum alle Linien der in der Probe vorkommenden Elemente im Meßbereich enthält, da auf diese Weise die Intensitätsverhältnisse der Linien für die Auswertung zugrunde gelegt werden können. Die notwendigen Korrekturfaktoren sollten in geeigneten Standards gemessen werden. Für viele Elemente ist es jedoch schwierig, geeignete Standards herzustellen, d.h. homogene Proben mit ausreichend hoher und bekannter Konzentration des Elements , das untersucht werden soll und in einer Schicht aufgetragen sein muß, die nicht über 500 nm dick sein darf (HOEFT u. SCHWAAB, 1985).

Da die GOLGI-Imprägnierung, wie schon erwähnt, ein Prozess ist, der zur Bildung unterschiedlicher Mengen von Silberchromatkristallen in den Zellen führt, konnte man bisher keinen geeigneten Standard für die Messungen an den De-Im-

prägnierungspräzipitaten herstellen. Es bleibt daher offen, ob die beiden Elemente in den Partikeln immer im selben Verhältnis zueinander vorkommen.

Die EDS-Mikroanalyse gibt uns keine Auskunft über die Frage ob Gold und Silber reduziert oder ionisiert vorkommen. Dennoch läßt sich von der Reihenfolge, in der die Reagenzien in dem Verfahren von FAIREN et al. (1977) eingesetzt werden, nämlich Goldchlorid gefolgt von Oxalsäure und Natrium-Thiosulfat (letzteres ist ein Fixiermittel aus der Fotografie), die Annahme ableiten, daß es sich hierbei um reduzierte Metallpartikel handelt. In der Gruppe 3 sind die GOLGI-imprägnierten Präparate zusammengefaßt, die nach dem fotochemischen Verfahren von BLACKSTAD behandelt wurden (BLACKSTAD, 1981). Obwohl in einer früheren Arbeit aus dem Laboratorium von BLACKSTAD (FREGERSLEV et al., 1971) postuliert wurde, daß das Silberchromat nicht lichtempfindlich sei, haben spätere Studien von BLACKSTAD (1975,1981) ergeben, daß unter Einfluß von UV-Licht und von polychromatischem Licht ein sogenanntes "latentes Bild" entstehen kann. In der Fotografie ist der Begriff "latentes Bild" sehr geläufig. In den Silberchromatkristallen könnten wie in einer Fotoemulsion sogenannte negativ geladene Reifekeime vorkommen. Die Chromionen können ein Lichquant absorbieren, wodurch von dem Chrom das negative Elektron losgelöst wird. Das Elektron wandert im Kristall und wird durch einen Reifekeim absorbiert. Die negativ geladenen Zentren der Reifekeime absorbieren die Silberionen und entladen sich unter Bildung von reduziertem Silber. Demnach besteht das "latente Bild" am Ende aus metallischem Silber. Das UV-Lichtverfahren besitzt den Nachteil geringer Eindringung von ca. 30 µm; deswegen hat diese Technik fast keine Anwendung gefunden. Das Verfahren mit polychromatischem Licht, kombiniert mit Goldchlorid-De-Imprägnierung, wurde von BLACKSTAD (1981) vorgeschlagen. Die Arbeitsbedingungen wurden aber erst durch FAIREN et al. (1981) und DE FELIPE u. FAIREN (1982) weiterentwickelt und standardisiert. Nach unseren

Befunden findet man in den nach diesen Verfahren de-imprägnierten Zellen Metallpartikel, die nur aus Gold bestehen. In diesem Fall scheint eine vollständige Substitution des Silbers, sowohl aus dem Silberchromat wie auch aus den reduzierten Kernen des "latenten Bildes", stattgefunden zu haben.

In der Gruppe 4 wurden die Partikel analysiert, die durch chemische Reduktion des Silberchromats im Gewebe entstehen. WOUTERLOOD et al.(1983) haben die Anwendung eines fotografischen Entwicklers , D 19-Kodak, für die Reduktion des Silberchromats vorgeschlagen. Übereinstimmend mit der Auffassung dieser Autoren zeigen unsere EDS-Messungen, daß nach der Behandlung der imprägnierten Zellen diese Partikel enthalten, die nur aus Silber bestehen können. WOUTERLOOD et al. (1983) führten eine Verfeinerung dieses Verfahrens ein, in dem sie an die Reduktion mit D 19 eine Behandlung mit Goldchlorid anschlossen (nach FAIREN et al., 1977). Durch diese Autoren wurde postuliert, daß nach der Reduktion und der Gold-Tonierung es durch eine Goldsubstitution des reduzierten Silbers zu einer Bildung von Goldpartikeln kommen sollte. Im Gegensatz dazu zeigen unsere Ergebnisse, daß beide Elemente, sowohl Gold als auch Silber, in hohen Konzentrationen in diesen Partikeln vorkommen. Es muß aber betont werden, daß bei diesem Verfahren die gefärbten Zellen auch zusätzlich mit Natrium-Thiosulfat behandelt wurden, sodaß daraus geschlossen werden kann, daß beide Elemente in reduzierter Form vorhanden sind.

Zu den Mechanismen der De-Imprägnierung

Die Anwendung der Gold-Tonierung ist ein klassisches Verfahren der Neurohistologie; es dient der Stabilisierung und Intensivierung reduzierter Silberfärbungen (FEIGIN u. NAOUMENKO, 1976). Läßt man im histologischen Schnitt reduziertes Silber mit Goldchlorid reagieren, gilt folgende Reaktion (SAMUEL, 1953):

$$3\ Ag + AuCl_3 = AU + 3\ AgCl$$

Das Gold wird sich im Schnitt an der Stelle der Silberpartikel niederschlagen. Die darauffolgende Behandlung mit Oxalsäure würde noch mehr Gold aus der Goldchloridlösung reduzieren und wahrscheinlich den Niederschlag von goldbeschichteten Silberpartikel herbeiführen. Silberionen, aus dem Silberchlorid, würden dann durch das Fixativum Natrium-Thiosulfat vom Schnitt entfernt (SAMUEL, 1953). Schließlich wäre zu erwähnen, daß die Intensität und Qualität der Gold-Tonierung von der Menge des im Schnitt zur Verfügung stehenden reduzierten Silber abhängt. In dem Verfahren von FAIREN et al. (1977) reagiert das Goldchlorid mit Silberionen. Untersuchungen von FREGESLEV et al. (1971) und von FAIREN et al. (1977) mit Natrium-Thiosulfat zeigten, daß normalerweise kein reduziertes Silber in den Silberchromatkristallen vorkommt. Die Silberchromatkristalle lösen sich mit NatriumThiosulfat vor der Gold-Tonierung völlig auf. Untersuchungen von SEHRWALD (1889) ergaben, daß bei der Reaktion zwischen Goldchlorid und Silberchromat Silberchlorid gebildet wird. Das in den Partikeln nach der Gold-Tonierung vorkommende Silber könnte durch Reduktion des Silberchlorids während der Tonierung entstehen. Dies ist jedoch keine plausible Erklärung, da in unserer Versuchsanordnung darauf geachtet wurde, die Einwirkung des Lichtes zu vermeiden. Mit Hilfe der SAMUELschen Theorie (1953) ist jedoch nicht erklärbar, wie die Bildung von gemischten Gold-Silber-Partikel bei der Gold-Tonierung zustande kommt. Durch die Einwirkung des polychromatischen Lichtes entsteht bei den fotochemischen Methoden wahrscheinlich ein "latentes Bild" (BLACKSTAD, 1981). In diesem Fall könnte die Mechanik des Tonierens mit Gold mit den Theorien von SAMUEL (1953) erklärt werden, da hier ein Kern von reduziertem Silber in den gefärbten Zellen vorliegt (FEIGIN u. NAOUMENKO, 1976). Nach Lichtexposition und Gold-Tonierung könnte dann, entsprechend unseren Befunden, eine vollständige Substitution des Silbers durch Gold stattfinden; deshalb bestehen am Ende des Prozesses die Partikel aus Gold. Die Reduktionsmethode

wurde durch WOOTERLOOD at al. (1983) auf chemischer Ebene nach den Theorien von SAMUEL (1953) gedeutet. Hierbei soll eine Substitution der Silberatome durch Gold in einem Verhältnis von drei Ag-Atome zu einem Au-Atom verlaufen. Deshalb sollte die reduzierte bzw. substituierte Menge Gold kleiner sein als die ursprüngliche von Silber, die vor der Substitution im Schnitt vorhanden war. Dieses würde die Morphologie der Präzipitate nach der Reduktion mit dem Entwickler und der Gold-Tonierung erklären. Diese Autoren gehen davon aus, daß nur in der Peripherie der Silberpartikel eine Substitution durch Gold stattfindet; deshalb bleibt nach der Behandlung mit Thiosulfat das Zentrum leer. Unsere Ergebnisse zeigen dagegen, daß die Partikel nach der Gold-Tonierung beide Elemente, Gold und Silber, enthalten. Dies bedeutet, daß bei der Gold-Tonierung eine vollständige Umstrukturierung der silberreduzierten Partikel stattfindet. Die Präzipitate könnten möglicherweise durch Ausflokkung von goldbeschichteten Silberpartikeln zu größeren Aggregaten entstehen. Das Zentrum mancher Partikel kann leer erscheinen, wenn oxidiertes Silber durch die Wirkung des Thiosulfates herausgelöst wird.

Zu der Methode und ihre Anwendungsmöglichkeiten:

Die (rasche) GOLGI-Methode wurde schon sehr früh in der Elektronenmikroskopie angewandt (STELL, 1964,1965; BLACKSTAD, 1965,1970; SOMOGYI, 1977,1978). Es wurden eine Reihe von Schwierigkeiten bekannt die die Anwendung dieser Methode stark einschränken. Sie reichen von der Ultramikrotomie bis zur Kontrastierung der Ultradünnschnitte (Empfindlichkeit der Kristalle gegenüber den Kontrastlösungen) (BLACKSTAD, 1970). Jediglich Untersuchungen in Kombination mit dem Hochspannungselektronenmikroskop lassen eine effektive Anwendung dieser Technik zu (CHAN-PALAY u. PALAY, 1972; CHAN-PALAY, 1973; SCOTT u. GUILLERY, 1974). Es ist möglich, durch eine unvollständige Imprägnierung eine fast

konventionelle TEM-Untersuchung zu betreiben (RIBI u. BERG, 1980). Für die Analyse von synaptischen Verbindungen sowie für die zytologische Charakterisierung von Nervenzellen scheint die De-Imprägnierungstechnik mit der Gold-Tonierung die am besten geeignete. Die Partikelgröße und die Strukturerhaltung des Materials sind in der Regel optimal. Die Präzipitate bleiben in den imprägnierten Zellen exakt lokalisiert, d.h. es treten keine Diffusionen auf. Mit Hilfe dieser Technik kann auch die Glia des ZNS untersucht werden. Voraussetzung dazu ist, daß die Gliazellen mit dem GOLGI-Verfahren imprägniert werden können. Mit den am meisten verwendeten GOLGI-Varianten (VALVERDE, 1970; MOREST, 1981) werden nur wenige Astrozyten der grauen Substanz dargestellt. Für die vielen anderen Zelltypen der Neuroglia sind spezielle GOLGI-Techniken unter Anwendung verschiedener Additive erforderlich (HORTEGA, 1928; KLATZO, 1952; RAMON-MOLINER, 1957). Sehr häufig ist die Anwendung dieser Zusätze nicht vereinbar mit der Präparation des Gewebes für die Elektronenmikroskopie. Mit der GOLGI-Imprägnierung nach VALVERDE (1970) kann man neben den Astrozyten, den sogenannten Tanyzyten, regelmäßig eine spezifische Gliaform darstellen, die in den Zirkumventrikulärorganen vorkommt. Mittels dieser Technik und der Gold-Tonierung nach FAIREN et al. (1977), sind Untersuchungen an Tanyzyten der Hirnrinde von Reptilien (WOUTERLOOD et al., 1981) und im Rückenmark der Ratte (RAFOLS u. GOSHGARIAN, 1985) erfolgt. Nach unserer Erfahrung stellen sich die Tanyzyten des Hypothalamus durch Gold-Tonierung schlecht dar; nur mit Hilfe des fotochemischen Verfahrens von BLACKSTAD (1981) ist ihre Markierung in EM gelungen. Sicherlich wird die Entwicklung neuer Techniken für die Glia die Möglichkeit des GOLGI-EM in diesem Bereich der Neurohistologie erweitern. Das fotochemische Verfahren von BLACKSTAD (1981) ermöglicht die Sichtbarmachung solcher Zellteile im EM, die schwach gefärbt sind und dadurch sehr empfindlich gegenüber der Gold-Tonierung

sind, wie z.B. Axonkollaterale (DE FELIPE u. FAIREN, 1981,-1982). Wie unsere Untersuchungen zeigen, können mit diesem Verfahren auch die Tanyzyten des Hypothalamus der Ratte dargestellt werden. Durch das Fehlen von Diffusionsartefakten und die gleichmäßige Verteilung der Goldpartikel ist die Identifizierung der imprägnierten Elemente leicht und sicher. Die Durchführung des Verfahrens ist trotz strenger Kontrolle der Lichtexposition unkompliziert und reproduzierbar.

Die Techniken

Die Reduktionsmethoden unter Anwendung fotografischer Entwickler weisen ein zentrales Problem, nämlich die Diffusion der Präzipitate, auf. Ende des vergangenen Jahrhunderts haben mehrere Autoren dieses Phänomen der Diffusion beschrieben (SEHRWALD, 1889; GREPPIN, 1889; ZIMMERMANN, 1898). Durch den hohen pH-Wert der meisten Fotoentwickler können sich die Silberchromatkristalle lösen, bevor das Silber reduziert werden kann (SEHRWALD). Die Silberionen könnten dann nicht nur aus der imprägnierten Zelle herausdiffundieren, sondern auch in Zellkompartimente, die normalerweise keine Präzipitate enthalten; dort werden sie durch den Entwickler reduziert. Das Auftreten von Metallpartikeln im Zellkern, in den Mitochondrien sowie in den synaptischen Vesikeln können in vielen Fällen ein Untersuchungsmaterial unbrauchbar machen, da diese Lokalisationen nicht mit denen des Original-GOLGI-Verfahrens in Einklang stehen (FAIREN et al., 1977). Obwohl WOUTERLOOD et al. 1983 das Vorkommen von Diffusionen erwähnen, betrachten sie dieses nicht als gravierendes Problem. Nach unseren Erfahrungen handelt es sich bei diesen Diffusionen um keine sporadische und zufällige Erscheinung. Sie stellen insofern einen negativen Aspekt des Verfahrens dar. Die zusätzliche Behandlung mit Goldchlorid verbessert hierbei in

keiner Weise die Resultate. Ähnliche Schwierigkeiten sind bei der Stabilisierung von GOLGI-Präparaten für die Lichtmikroskopie mit Natriumbromid und D 19 Kodak (GEISERT u. UPDYKE, 1977) beschrieben worden. Für die Untersuchung der Glia haben sich diese Techniken als nicht geeignet erwiesen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ADAMS, J.C.: A fast, reliable silver-chromate Golgi method for perfusion-fixed tissue. Stain Technol. 54, 225-226, 1979

BASSEMIR, U.K. STRAUSFELD, N.J.: Block intensification an X-ray microanalysis of cobalt-filled neurons for electron microscopy. In: Functional Neuroanatomy. Strausfeld, N.J. (ed.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg pp. 19-43, 1983

BLACKSTAD, T.W.: Mappimg of experimental axon degeneration by electron microscopy of Golgi preparations. Z. Zellforsch. 67, 819-834, 1965

BLACKSTAD, T.W.: Electron microscopy of Golgi preparations for the study of neuronal relations. In: Contemporary Research Methods in Neuroanatomy. Nauta, W. and Ebbesson, S. (eds.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 186-216, 1970

BLACKSTAD, T.W.: Golgi preparations for electron microscopy: Controlled reduction of silver chromate by ultraviolet illumination. Golgi Centennial Symposium Proceedings. Santini, M. (ed.) Raven Press, New York pp. 123-132, 1975

BLACKSTAD, T.W.: Tract tracing by electron microscopy of Golgi preparations. In: Neuroanatomical Tract-tracing Methods. Heimer, L. and Robards, M.J. (eds.) Plenum Press, New York, London pp. 407-440, 1981

BOLAN, J.P., WAINER, B.H., SMITH, A.D.: Characterization of cholinergic neurons in the rat neostriatum. A combination of choline acetyltransferase immunocytochemistry, Golgi-impregnation and electron microscopy. Neuroscience 12, 711-718, 1984

BRAAK, H. BRAAK, E.: Simple procedure for electron microscopy of Golgi impregnated nerve cells. Neurosci. Lett. 32, 1-4, 1982

BRAAK, H. BRAAK, E.: Golgi preparations as a tool in neuropathology with particular reference to investigations of the human telecephalic cortex. Progr. Neurobiol. 25, 93-139, 1985

BRAITENBERG, V.; GUGLIELMOTTI, V., SADA, E.: Correlation of crystal growth with the staining of axons by the Golgi procedure. Stain Technol. 42, 277-283, 1967

CHAN-PALAY, V. PALAY, S.L.: High voltage electron microscopy of rapid Golgi preparations. Neurons and their processes in the cerebellar cortex of monkey and rat. Z. Anat. Entw. Gesch. 137, 125-152, 1972

CHAN-PALAY, V: A brief note on the chemical nature of the precipitate within nerve fibers after the rapid Golgi reaction: Selected area diffraction in high voltage electron microscopy. Z. Anat. Entw. Gesch. 139, 115-117, 1973

CHANDLER, J.A.: X-ray microanalysis in the electron microscope. In: Practical Methods in Electron Microscopy. Glauert, A.M. (ed.) Elsevier/North Holland Publishing Company Amsterdam, New York, 1977

DE FELIPE, J.
FAIREN, A.: Interneurons with axonal arcades in the cat visual cortex. A Golgi-EM study. Neurosci. Lett., Suppl. 7, 399, 1981

DE FELIPE, J.
FAIREN, A.: A type of basket cell in superficial layers of the cat visual cortex. A Golgi-electron microscope study. Brain Res. 244, 9-16, 1982

FAIREN, A.,
PETERS, A.,
SALDANHA, J.: A new procedure for examining Golgi impregnates neurons by light and electron microscopy. J. Neurocytol. 6, 311-337, 1977

FAIREN, A.,
DE FELIPE, J.,
MARTINEZ-RUIZ, R.: The Golgi-EM procedure: A tool to study neocortical interneurons. Eleventh Intern. Congress of Anatomy: Glial and Neuronal Cell Biology, Progress in Clinical and Biological Research. Acosta-Vidrio, E. and Fedoroff, S. (eds.) Vol. 59A. Alan R. Liss, Inc. New York pp. 291-301, 1981

FEIGIN, I.
NAOUMENKO, J.: Some chemical principles applicable to some silver and gold methods for neuropathological studies. J. Neuropath. and Exp. Neurol. 35, 495-507, 1976

FREGESLEV, S.,
BLACKSTAD, W.,
FREDENS, K.,
HOLM, M.J.: Golgi-potassium-dichromate silver-nitrate impregnation. Nature of the precipitate studied by X-ray powder diffraction methods. Histochemie 25, 63-71, 1971

FREUND, T.
SOMOGYI, P.: The section-Golgi impregnation procedure. I. Description of the method and its combination with histochemistry after intracellular iontophoresis or retrograde transport of horseradish peroxidase. Neuroscience 2, 463-474, 1983

FROTSCHER, M.
ZIMMER; J.: Commissural fibers terminate on non-pyramidal neurons in the guinea pig hippocampus - a comined Golgi-EM degeneration study. Brain Res. 265, 289-292, 1983

FROTSCHER, M.
LERANTH, C.: The cholinergic innervation of the rat fascia dentata: Identification of target structures on granule cells by combining choline acetyltransferase immunocytochemistry and Golgi impregnation. J. comp. Neurol. 243, 58-70, 1986

GEISERT, E.E.
UPDYKE, B.V.: Chemical stabilzation of Golgi silver chromate impregnations. Stain. Technol. 52, 137-141, 1977

GOEBEL, D.J.
POURCHO, R.G.: Morphological and neurochemical characterization of individual retinal neurona: A combined Golgi and autoradiographic technique. J. Neurosci. Methods 6, 295-304, 1982

GOLGI, C.: Sulla struttura della sostanza grigia dell cervello. Gazz. medica ital. lombarda 33, 244-246, 1873

GONZALEZ, F.A.
DE ROBERTIS, E.: A formalin-perfusion fixation method for histophysiological study of the central nervous system with the electron microscope. Neurology 13, 758-777, 1963

GREPPIN, L.: Weiterer Beitrag zur Kenntnis der Golgi'schen Untersuchungsmethode des zentralen Nervensystems. Arch. Anat. Physiol. (Anat. Abt.) Suppl. 55-77, 1889

HACKNEY, C.M.
ALTMAN, J.S.: Rubeanic acid and X-ray microanalysis for demonstrating metal ions in filled neurons. In: Functional Neuroanatomy. Strausfeld, N.J. (ed.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 96-111, 1983

HITCHCOK P.F.
HICKEY, T.L.: A method for combining Golgi impregnation procedures and light microscopic autoradiography. J. Neurosci. Methods 8, 149-154, 1983

HOEFT, H.
SCHWAAB, P.: Untersuchungen zur Überprüfung von Korrekturverfahren für die EDS-Analyse dünner Schichten. Beitr. elektronenmikroskop. Direktabb. Oberfl. 18, 11-20, 1985

HORTEGA, P. DEL RIO: Tercera aportación al conocimiento morfólogico e interpretación funcional de la oligodendroglia Mem. Soc. Esp. Hist. Nat. 14, 5, 1928

ITO, H.
ATENCIO, F.: Staining methods for an electron microscopic analysis of Golgi impregnated nervous tissue and a demonstration of the synaptic distribution upon pulvinar neurons. J. Neurocytol. 5, 297-317, 1976

JACOBSON, M.: Developmental Neurobiology. Plenum Press, New York 2.Aufl. 1978

KLATZO, I.: A study of glioblastoma multiforme by the Golgi method. Anat. J. Path. 28, 357-369, 1952

MOREST, D.K.: The Golgi methods. In: Techniques in Neuroanatomical Research. Heym, C. and Forssmann, W.G. (eds.) Springer-Verlag, Berlin pp. 124-138, 1981

RAFOLS, J.A.
GOSHGARIAN, H.G.: Spinal tanycytes in the adult rat: a correlative Golgi gold-toning study. Anat. Rec. 211, 75-86, 1985

RAMON Y CAJAL, S.: Die Neuronlehre. Handbuch der Neurologie Band 1 Allg. Neurol. 887-995, 1935

RAMON Y CAJAL,S.
DE CASTRO, F.: Elementos de tecnica micrografica del sistema nervioso. Salvat Editores, Barcelona 2. Aufl., 1972

RAMON-MOLINER, E.: A chlorate-formaldehyde modification of the Golgi method. Stain Technol. 32, 105-115, 1957

RAMON-MOLINER, E.
FERRARI, J.: Electron microscopy of previously identified cells and processes within the central nervous system. J. Neurocytol. 1, 85-100, 1972

RAMON-MOLINER, E.
FERRARI, J.: Electron microscopy of Golgi-stained material following lead chromate substitution. Brain Res. 103, 339-344, 1976

RAMON-MOLINER, E.: Persönliche Mitteilung. 1985

REYNOLDS, E.S.: The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17, 208-212, 1963

RIBI, W.A.
BERG, G. J.: Light and electron microscopic structure of Golgi-stained neurons in the vertebrate brain (new rapid Golgi procedure). Cell Tissue Res. 205, 1-10, 1980

RIBI, W.A.: Electron microscopy of Golgi-impregnated neurons. In: Functional Neuroanatomy. Strausfeld, N.J. (ed.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg pp. 1-18, 1983

RICHARDSON, K.C.,
JARETT, L.,
FINKE, E.H.: Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. Stain Technol. 35, 313-325, 1960

SAMUEL, E.P.: Gold toning. Stain Technol. 28, 225-229, 1953

SCHEIBEL, M.E.
SCHEIBEL, A.B.: Some structural and functional substrates of development in young cats. In: The Developing Brain, Himwich, W. and Himwich, H. (eds.) Elsevier Press, Amsterdam pp. 6-25, 1964

SCHEIBEL; M.E.
SCHEIBEL, A.B.: The rapid Golgi method. Indian summer or renaissance? In: Contemporary Research Methods in Neuroanatomy. Nauta, W. and Ebbesson, S. (eds.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg pp. 1-11, 1970

SCHEIBEL, M.E.
SCHEIBEL, A.B.: The methods of Golgi. In: Neuroanatomical Research Techniques. Robertson, R.T. (ed.) Academic Press, New York pp. 90-114, 1978

SCOTT, G.L.
GUILLERY, R.W.: Studies with the high voltage electron-microscope of normal, degenerating, and Golgi impregnated neuronal processes. J. Neurocytol. 3, 567-590, 1974

SEHRWALD, E.: Zur Technik der Golgi'schen Färbung. Arch. wiss. Mikroskopie 6, 443-456, 1889

SOMOGYI, P.: A specific 'axo-axonal' interneuron in the visual cortex of the rat. Brain Res. 136, 345-350, 1977

SOMOGYI, P.: The study of Golgi stained cells and of experimental degeneration under the electron microscope: a direct method for the identification in the visual cortex of three successive links in a neuron chain. Neuroscience 3, 167-180, 1978

SOMOGYI, P.,
FREUND, T.F.,
WU, J.-Y.,
SMITH, A.D.: The section Golgi impregnation procedure. 2. Immunocytochemical demonstration of glutamate decarboxylase in Golgi-impregnated neurons and in their afferent synaptic boutons in the visual cortex of the cat. Neuroscience 9, 475-490, 1983

SOMOGYI, P.,
KISVARDAY, Z.F:,
FREUND, T.F:,
COWEY, A.: Characterization by Golgi impregnation of neurons that accumulate ^{3}H-GABA in the visual cortex of monkey. Expl. Brain Res. 53, 295-303, 1984

SOMOGYI, P., FREUND, T.F., KISVARDAY, Z.F.: Different types of ^{3}H-GABA accumulating neurons in the visual cortex of the rat. Characterization by combined autoradiography and Golgi impregnation. Expl. Brain Res. 54, 45-56, 1984

STELL, W.K.: Correlated light and electron microscope oberservations on Golgi preparations of goldfish retina. J. Cell Biology 23, 89A, 1964

STELL, W.K.: Correlation of retinal cytoarchitecture and ultrastrucure in Golgi preparations. Anat. Rec. 153, 389-398, 1965

VALVERDE, F.: The Golgi method. A tool for comparative structural analyses. In: Contemporary Research Methods in Neuroanatomy. Nauta, W. and Ebbesson, S. (eds.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg pp. 12-31, 1970

WILLIAMS, R.S., FERRANTE, R.J., CAVINESS, V.S.: The Golgi rapid method in clinical neuropathology: The morphologic consequences of suboptimal fixation. J. Neuropath. exp. Neurol. 37, 13-33, 1978

WOUTERLOOD, F.G., ALONES, V.E., LOHMAN, A.H.M.: An electron microscopic study of the mediodorsal cerebral cortex in the lizard Agama agama. Anat. Embryol. 163, 185-200, 1981

WOUTERLOOD, F.G., NEDERLOF, J., PANIRY, S.: Chemical reduction of silver chromate: A procedure for electron microscopical analysis of Golgi-impregnated neurons. J. Neurosci. Methods 7, 295-308, 1983

WOUTERLOOD, F.G. MUGNAINI, E.: Cartwheel neurons of the dorsal cochlear nucleus: A Golgi-electron microscopic study in rat. J. comp. Neurol. 227, 136-157, 1984

ZIMMERMANN, K.W.: Beiträge zur Kenntnis einiger Drüsen und Epithelien. Arch. mikr. Anat. 52, 552-706, 1898

7. D A N K

Hiermit möchte ich Herrn Prof. Dr. P. Mestres meinen besonderen Dank sagen für die Bereitstellung des Themas und vor allem für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Labor. Er hat mit stetem Interesse und fruchtbaren Diskussionen in freundlicher Weise diese Arbeit ermöglicht und gefördert.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Dickenscheid, der mich in die Methodik der REM-Mikroanalyse einführte und einen großen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet hat.

Außerdem herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. H. G. Fromme für seine Unterstützung und Mitarbeit bei der TEM-Mikroanalyse. Nach seinem plötzlichen Tod während unserer Untersuchungen führte Frau Dr. M. Grote die Versuche weiter, der ich hiermit ebenfalls zu besonderem Dank verpflichtet bin.

Herrn Prof. Dr. K.-H. Booz hat mit wertvollen Anregungen zur Korrektur des Manuskripts beigetragen. Ihm und Frau Luckscheiter, die mit Geduld und Ausdauer an der Fertigstellung dieser Arbeit mitwirkte, möchte ich schließlich ebenfalls herzlich danken.

8. LEBENSLAUF

Name: Felipe Luis SCHNEIDER

Geburtsdatum: 15. Juni 1952

Geburtsort: Porto Alegre, Brasilien

Nationalität: Brasilianisch

Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

Eltern: Germano L. Schneider, Beamter
Jolanda R. Schneider geb. Remião, Hausfrau

Grundschule: 1959 - 1963, Colégio Mauá, Santa Cruz do Sol, Brasilien

Gymnasium: 1964 - 1970, Colégio Mauá, Santa Cruz do Sol, Brasilien

Hochschulausbildung:

1971 - 1976 Medizinstudium an der Fundação Faculdade Católica de Medicina de Porto Alegre (Stiftung Katholische Medizinische Fakultät von Porto Alegre, Brasilien).

1978 - 1982 Postgraduiertenstudium zur Erlangung des Titels eines Magisters der Neuroanatomie.
Titel der Dissertation:
" Das Subfornikale Organ der Ratte " -
Prädikat " A ".
An der Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) = Bundesuniversität von Rio Grande do Sul) in Porto Alegre, Brasilien.

Lehrtätigkeit:

ab 1977 - 1980 " Professor colaborador " (1. Stufe der Lehrerkarriere) für " Menschliche Anatomie " -
Schwerpunkt " Neuroanatomie ", in der Abteilung für Morphologische Wissenschaften des Instituts für Biowissenschaften der Bundesuniversität von Rio Grande do Sul.

ab 1981 Assistent für das Fach " Menschliche Anatomie ", Schwerpunkt " Neuroanatomie ", an der oben genannten Abteilung.

Stipendium Ab September 1984 Stipendiat des Deutschen Akademischen Austauschdienstes an der Universität des Saarlandes.